

09/284180

PCT/JP 97/03549

日 本 国 特 許 庁

03.10.97

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

01.12.1997

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1996年10月 9日

出 願 番 号

Application Number:

平成 8年特許願第287636号

出 願 人

Applicant (s):

住友製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年11月14日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井 寿光

出証番号 出証特平09-3092184

【書類名】 特許願

【整理番号】 132329

【提出日】 平成 8年10月 9日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12
C07H 21/00

【発明の名称】 新規セマフォリン遺伝子：セマフォリンW

【請求項の数】 29

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製
薬株式会社内

【氏名】 木村 徹

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製
薬株式会社内

【氏名】 菊地 薫

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代表者】 武内 正康

【代理人】

【識別番号】 100107629

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 敏夫

【電話番号】 06-466-5214

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

特平 8—287636

【包括委任状番号】 9602171

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規セマフォリン遺伝子：セマフォリンW

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNA。

【請求項2】 配列表の配列番号：2に記載の塩基配列からなるオープンリーディングフレーム。

【請求項3】 配列表の配列番号：3に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項4】 配列表の配列番号：4に記載の塩基配列を有するDNA。

【請求項5】 配列表の配列番号：5に記載の塩基配列を有するオープンリーディングフレーム。

【請求項6】 配列表の配列番号：6に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

【請求項7】 配列表の配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、セマフォリンドメインを有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項8】 請求項7記載のDNAがコードするタンパク質。

【請求項9】 請求項1又は請求項4記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、中枢神経再生阻止活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項10】 請求項9記載のDNAがコードするタンパク質。

【請求項11】 請求項3又は請求項6記載のタンパク質において1もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換されている、中枢神経再生阻止活性を有する誘導タンパク質をコードするDNA。

【請求項12】 請求項11記載のDNAがコードする誘導タンパク質。

【請求項13】 請求項3又は請求項6記載のタンパク質において1もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換されている、中枢神経再生促進活性を有する誘導タンパク質をコードするDNA。

【請求項14】 請求項13記載のDNAがコードする誘導タンパク質。

【請求項15】 ヒトcDNAライブラリー又はヒトゲノムライブラリーからクローニングされるDNAであって、請求項1又は請求項4記載のDNAの全部又は一部、又はその相補鎖の全部又は一部からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項16】 請求項1、請求項2、請求項4、請求項5、請求項7、請求項9、請求項11、請求項13又は請求項15記載のDNAのいずれかを発現する発現プラスミド。

【請求項17】 請求項16記載の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体。

【請求項18】 請求項17記載の形質転換体を、請求項16記載の発現プラスミドの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、組み換えタンパク質の生産方法。

【請求項19】 請求項3、請求項6、請求項8、請求項10、請求項12又は請求項14記載のいずれかのタンパク質の全部又は一部を含むポリペプチド。

【請求項20】 配列表の配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第204位のグルタミン酸、あるいは該グルタミン酸の位置に相当するアミノ酸を含有することを特徴とする、請求項19記載のポリペプチド。

【請求項21】 請求項1、請求項4、請求項7、請求項9又は請求項15記載のいずれかのDNAの全部又は一部に相補的な配列を有するDNA又はRNA、あるいはそれらの化学的修飾体。

【請求項22】 請求項3、請求項6、請求項8又は請求項10記載のいずれかのタンパク質の発現を抑制することを特徴とする、請求項21記載のDNA又はRNA、あるいはそれらの化学的修飾体。

【請求項23】 請求項3、請求項6、請求項8、請求項10、請求項12記載のいずれかのタンパク質又は請求項19、請求項20記載のいずれかのポリペプチドに対する抗体。

【請求項24】 請求項3、請求項6、請求項8、請求項10又は請求項12記載のいずれかのタンパク質を用いることを特徴とする、セマフォリンW阻害

物質のスクリーニング方法。

【請求項25】 請求項24記載のスクリーニング方法を用いて得られるセマフォリンW阻害物質。

【請求項26】 請求項14記載の誘導タンパク質、請求項19又は請求項20記載のポリペプチド、あるいは請求項23記載の抗体からなる、請求項25記載のセマフォリンW阻害物質。

【請求項27】 請求項22記載のDNA又はRNA、あるいはそれらの化学的修飾体、請求項25又は請求項26記載のセマフォリンW阻害物質の一つ又はそれ以上を含有することを特徴とする、中枢神経の再生治療促進剤。

【請求項28】 請求項3、請求項6、請求項8、請求項10又は請求項12記載のタンパク質の一つ又はそれ以上を含有することを特徴とする、末梢神経の伸長抑制剤。

【請求項29】 請求項1、請求項4、請求項7又は請求項9記載のDNAのいずれかを有するか、あるいはいずれかをノックアウトさせたトランスジェニック動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、セマフォリンファミリーに属する新規なセマフォリン、セマフォリンWおよび該セマフォリンWの医薬・研究用試薬への利用に関する。さらに詳しくは、成体の中枢神経系全般に強く発現しているセマフォリンW遺伝子及びその発現タンパク質、または該セマフォリンW遺伝子にハイブリダイズする他のセマフォリン、該セマフォリンWの誘導タンパク質、該セマフォリンWの部分ペプチド、該セマフォリンWに対する抗体、該セマフォリンW遺伝子に相補的なDNA又はRNA、或いはこれらの物質の医薬あるいは研究用試薬としての用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒトなど高等生物では中枢神経は一度傷害を受けると再生する能力がないこと

が広く知られている。このため交通事故などで脊髄の損傷を受けた人は、半生を半身不随として過ごさなければならない。一方、末梢神経はこれらの高等生物においても旺盛な再生能が保持されており、手足の神経は一度切断されても徐々に再生し、それに伴って機能も回復することが知られている。

1980年代初期にAguayoらのグループは、損傷を与えた高等生物の中枢神経中に実験的に末梢神経を移植することにより中枢神経の軸索伸長が誘導されることを見出し、それまで一般に再生能力はないと考えられていた高等生物の中枢神経が、周囲の環境さえ整えば軸索を再生することを明らかにした (Nature, 284, 264-265(1980)、Science, 214, 931-933(1981))。この報告は、高等生物の中枢神経系には「中枢神経再生阻止因子」とでも呼べるような因子が存在しており、この因子が中枢神経の再生を抑制している可能性、そしてその抑制を解除することにより中枢神経が再生する可能性を示唆しており、中枢神経再生治療への道を開いた。

【0003】

1988年にSchwabらのグループは、中枢神経系のミエリン由来のタンパク質の中に、上記中枢神経再生阻止因子が存在していることを明らかにした。そして、該中枢神経再生阻止活性を有するタンパク質を部分的ながら精製することに成功し、このタンパク質画分をNI35/250と名付けた (Annu. Rev. Neurosci., 16, 565-595(1993))。しかし、その単離・同定及び遺伝子クローニングは未だに成功していない。また、彼らは粗精製した NI35/250 を動物に免疫し、中和活性を有する抗体 (IN-1) を取得することにも成功している。この抗体はウエスタンブロットで NI35/250 のバンドを認識し、免疫染色で NI35/250 が分布していると考えられる部位を染めることができる。そして、実験的に脊髄を損傷させた動物にこの抗体を投与すると、2-3週間後には脊髄の神経が部分的ながら再生すること、更に2-3か月後には機能も回復することを明らかにしている (Nature, 343, 269-272(1990)、Nature, 378, 498-501(1995))。これは、まさに前記 Aguayo により示唆された中枢神経再生阻止因子の存在、及び該因子の活性を阻止することによる中枢神経の再生を実験的に証明したものであり、その価値は大きい。しかし該抗体はヒト型ではなくラット型NI35/250に対する抗体であり、また安定性、特

異性も低い。また上述のように該抗体の投与により再生が認められたものの、その効果は部分的かつ不完全であり、全ての運動機能が回復したわけではない。従ってこれら問題点の解決策として、NI35/250あるいはこれに相当する中枢神経再生阻止因子の遺伝子の実体を明らかにし、分子生物、神経科学等の知見に基づいて、中枢神経再生阻止活性をより効果的に阻害する阻害物質を開発すること、あるいは該再生阻止因子の遺伝子の発現抑制方法を開発することが不可欠であると考えられる。

【0004】

ところで中枢・末梢を問わず神経系がその主な機能である情報伝達・処理を正確に行うためには、発生過程、すなわち胚あるいは胎児の段階において、神経細胞間あるいは神経細胞と末梢の受容器・効果器との間に複雑な神経ネットワークを形成しなければならない。神経ネットワーク形成のためには、伸長する神経突起を遠く離れた標的部位に正確に導く（ガイドする）巧みな機構が必要である。

これまでは、神経ネットワークの形成には突起伸長促進因子・突起誘引因子と言った神経の突起伸長を正に制御する因子が主な役割を果たしているものと考えられてきた。しかしそれとは逆の、つまり伸長阻止活性を持った負の因子が正確なガイダンスには重要であることが、ネットワーク形成メカニズムに関する最近の研究から明らかになりつつある（Cell, 78, 353-356(1994)）。

【0005】

このような伸長阻止活性を有する因子の代表が、「セマフォリン」と呼ばれるタンパク質である。最初に発見されたセマフォリンはバッタから発見されたファシクリンIVであり、その後、ニワトリからコラプシン（後にコラプシンIと命名）が発見され（Cell, 75, 217-227(1993)；Neuron, 9, 831-845(1992)）、ショウジョウバエ、カブトと言った昆虫からヒトまたはウイルスにまで広く、10以上のセマフォリンファミリーに属する遺伝子が報告されている（Cell, 81, 471-474(1995)）。これらのセマフォリンは、そのアミノ酸配列上にセマフォリンドメインと呼ばれるおよそ500アミノ酸からなる類似の構造を有するのが特徴である（Neuron, 14, 941-948(1995)、Cell, 75, 1389-1399(1993)）。しかし、セマフォリン遺伝子相互の間でセマフォリンドメインのアミノ酸一次配列上の類似性は8

0%-20%であり、必ずしも高くはない。

これらのセマフォリンの中で機能が確認されているものはバツタのファシクリン IV、ショウジョウバエのセマフォリンI,II、ニワトリのコラブシン、そしてほ乳類におけるコラブシンであるセマフォリンIII などごく一部であり、これらは全て神経突起の伸長、シナプス形成に対して抑制的に機能することが知られている。中でもセマフォリンIII は、*in vitro*において培養神経の成長円錐を短時間に退縮させる活性（成長円錐退縮活性）をも有することが報告されている（*Neuron*, 14, 941-948(1995)、*Neuron*, 14, 949-959(1995)、*Cell*, 81, 631-639(1995)、*Cell*, 75, 1389-1399(1993)、*Cell*, 75, 217-227(1993)、*Neuron*, 9, 831-845(1992)）。

【0006】

以上のようにセマフォリンは発生段階において成長円錐退縮活性及び神経突起の伸長抑制活性を有し、神経の正確なガイダンスを行う役割を担っていることが明らかになりつつあるが、これらセマフォリンが発生段階のみならず、成体においても何らかの機能を有しているのか否かは現在のところ明らかにされていない。ましてやセマフォリンが、成体における中枢神経の再生阻止因子としての役割を担っているか否かは全く不明である。勿論、セマフォリンは神経突起伸長を抑制する負のガイダンス因子であることが明らかにされているため、該セマフォリンを中枢神経の再生阻止因子の候補として考えることもできなくはない（*Nature*, 378, 439-440(1995)）。しかし、高等生物で唯一機能解析がなされているセマフォリンIII（Sema III）は、末梢神経である感覚神経あるいは交感神経に対しては突起伸長阻止活性を示すが、中枢神経である網膜神経に対しては作用しないことが *in vitro* の実験結果により明らかにされている（*Cell*, 75, 217-227(1993)）。加えて、本発明者らがSemaIIIの成体における発現分布をノーザン解析により調べた結果、主に中枢神経以外の神経・組織で発現していることが判明している（後述の参考例2参照）。従って、このような Sema III が「中枢神経再生阻止因子」としての機能を有しているとは考え難い状況にある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする主たる課題は、成体の中枢神経系全般に強く発現する新規なセマフォリン、セマフォリンW及びその遺伝子を提供することにより、中枢神経再生に関わる医薬あるいは研究用試薬を提供することにある。本発明のセマフォリンWの発見に伴い、該セマフォリンW遺伝子にハイブリダイズする他のセマフォリン、該セマフォリンWの誘導タンパク質、該セマフォリンWの部分ペプチド、抗体、該セマフォリンW遺伝子に相補的なDNA又はRNA、該セマフォリンWを用いたセマフォリンW阻害物質のスクリーニング方法、該スクリーニング法により得られるセマフォリンW阻害物質、そして該阻害物質を含有する医薬組成物、或いは該セマフォリンWについてのトランスジェニック動物等をも提供するものである。またセマフォリンWの発見に伴い、セマフォリンWに関する研究用試薬をも提供するものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

「従来の技術」の項でも述べたように、成体において中枢神経の再生が常に阻止された状態にあるのならば、この中枢神経の再生を阻止する因子を同定することが中枢神経の再生治療にとって最も重要な課題であり、また該因子の同定なくしては中枢神経の再生治療は有り得ないと思われる。

本発明者らは、前述のNI35/250と負のガイダンス因子であるセマフォリンとのin vitro活性の類似性、すなわちNI35/250はin vitroで成長円錐退縮活性及び神経の突起伸長抑制活性を有しているのに対し(J.Neurosci., 8, 2381-2393 (1988)、Science, 259, 80 (1993))、既知のセマフォリンも突起伸長抑制活性を有しており、中でもセマフォリンIIIは成長円錐退縮活性も有しているという点に着目し、未だ同定されていない未知のセマフォリンの中に、中枢神経の再生阻止因子としての機能を有するものが存在している可能性を考えた。すなわち、1)成体の中枢神経系で強く発現しており、2)神経の再生(伸長)が抑制されていない成体の末梢組織や胎児等ではあまり発現していない、といった特徴を有するセマフォリンは未だ知られていないが、そのような特徴を有する未知のセマフォリンを同定することができれば、該セマフォリンこそが中枢神経の再生阻止因子として機能しているのではないかと考えた。

【0009】

そこでまず、これまで報告されているセマフォリン遺伝子相互の間で比較的よく保存されているアミノ酸をコードするDNA配列を、EST (Expressed Sequence Tags) データベースにより検索したところ、セマフォリン間で非常に良く保存されている7個のアミノ酸からなる配列 (Gln(またはArg)-Asp-Pro-Tyr-Cys-Ala (またはGly)-Trp) と非常に似た配列であるGln-Asp-Pro-Val-Cys-Ala-Trp を一部配列としてコードするDNA断片配列、T09073を見い出した。

このT09073配列中には解読されていない塩基が存在しており、またオープンリーディングフレームを決定することもできなかったため、このT09073が「セマフォリン」をコードする遺伝子の一部に該当するとは、この段階では結論することができなかった。さらにこのT09073は、ヒト小児脳のcDNAライブラリー由来の配列としてデータベースに登録されたものであるが、胎児や成体の末梢組織で発現しているかどうかは不明であり、我々の目的とする「中枢神経再生阻止因子」としての機能を有するセマフォリン遺伝子の一部に該当するものとは結論することができなかった。

そこでまず、このT09073を有する遺伝子の発現分布を見るために、T09073の5'側196塩基対よりなるDNA断片をプローブに用いてノーザン解析を行った。その結果、この遺伝子は成体の中枢神経組織では広く発現しているが、それ以外では胎児期、生後を通じて成体の肺および脾臓でのみ発現していることが見出されたため、まさに中枢神経再生阻止因子の遺伝子として期待される発現分布を示すことが明らかとなった。

【0010】

そこで次に、この遺伝子の全長をクローニングして新規セマフォリンであるか否かを判断することとした。すなわち、上記196塩基対よりなるDNA断片をプローブとしてラットcDNAライブラリーをスクリーニングした結果、クローニングされた遺伝子はセマフォリンに特有の配列を有する新規セマフォリン遺伝子であることが判明した。我々は、この新規セマフォリンを「セマフォリンW」と命名した。

このようなセマフォリンWの発見に伴い、中枢神経再生に係わる医薬、或いは

該セマフォリンWに関する研究のための試薬を提供することが可能となる。

本発明は、以上のような研究成果に基づき完成するに至ったものである。

【0011】

即ち本発明の要旨は、

- (1) 配列表の配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNA、
- (2) 配列表の配列番号：2に記載の塩基配列からなるオープンリーディングフレーム、
- (3) 配列表の配列番号：3に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、
- (4) 配列表の配列番号：4に記載の塩基配列を有するDNA、
- (5) 配列表の配列番号：5に記載の塩基配列を有するオープンリーディングフレーム、
- (6) 配列表の配列番号：6に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、
- (7) 配列表の配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、セマフォリンドメインを有するタンパク質をコードするDNA、
- (8) 前記(7)に記載のDNAがコードするタンパク質、
- (9) 前記(1)又は(4)に記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、中枢神経再生阻止活性を有するタンパク質をコードするDNA、
- (10) 前記(9)に記載のDNAがコードするタンパク質、
- (11) 前記(3)又は(6)に記載のタンパク質において1もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換されている、中枢神経再生阻止活性を有する誘導タンパク質をコードするDNA、
- (12) 前記(11)に記載のDNAがコードする誘導タンパク質、
- (13) 前記(3)又は(6)に記載のタンパク質において1もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換されている、中枢神経再生促進活性を有する誘導タンパク質をコードするDNA、
- (14) 前記(13)に記載のDNAがコードする誘導タンパク質、
- (15) ヒトcDNAライブラリー又はヒトゲノムライブラリーからクローニ

ングされるDNAであって、前記(1)又は(4)に記載のDNAの全部又は一部、又はその相補鎖の全部又は一部からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、

(16) 前記(1)、(2)、(4)、(5)、(7)、(9)、(11)、(13)又は(15)に記載のDNAのいずれかを発現する発現プラスミド、

(17) 前記(16)に記載の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体、

(18) 前記(17)に記載の形質転換体を、前記(16)に記載の発現プラスミドの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、組み換えタンパク質の生産方法、

(19) 前記(3)、(6)、(8)、(10)、(12)又は(14)に記載のいずれかのタンパク質の全部又は一部を含むポリペプチド、

(20) 配列表の配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第204位のグルタミン酸、あるいは該グルタミン酸の位置に相当するアミノ酸を含有することを特徴とする、前記(19)に記載のポリペプチド、

(21) 前記(1)、(4)、(7)、(9)又は(15)に記載のいずれかのDNAの全部又は一部に相補的な配列を有するDNA又はRNA、あるいはそれらの化学的修飾体、

(22) 前記(3)、(6)、(8)又は(10)に記載のいずれかのタンパク質の発現を抑制することを特徴とする、前記(21)に記載のDNA又はRNA、あるいはそれらの化学的修飾体、

(23) 前記(3)、(6)、(8)、(10)、(12)に記載のいずれかのタンパク質又は前記(19)、(20)に記載のいずれかのポリペプチドに対する抗体、

(24) 前記(3)、(6)、(8)、(10)又は(12)に記載のいずれかのタンパク質を用いることを特徴とする、セマフォリンW阻害物質のスクリーニング方法、

(25) 前記(24)に記載のスクリーニング方法を用いて得られるセマフォリンW阻害物質、

(26) 前記(14)に記載の誘導タンパク質、前記(19)又は(20)に記載のポリペプチド、あるいは前記(23)に記載の抗体からなる、前記(25)に記載のセマフォリンW阻害物質、

(27) 前記(22)に記載のDNA又はRNA、あるいはそれらの化学的修飾体、前記(25)又は(26)に記載のセマフォリンW阻害物質の一つ又はそれ以上を含有することを特徴とする、中枢神経の再生治療促進剤、

(28) 前記(3)、(6)、(8)、(10)又は(12)に記載のタンパク質の一つ又はそれ以上を含有することを特徴とする、末梢神経の伸長抑制剤、並びに

(29) 前記(1)、(4)、(7)又は(9)に記載のDNAのいずれかを有するか、あるいはいずれかをノックアウトさせたトランスジェニック動物、に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明の第1の態様は、配列表の配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAであって、本発明の代表的なタンパク質、ラットセマフォリンWをコードするcDNAである。該DNAは、例えば実施例3に記載したように、ESTデータベースから発見された「T09073」の配列を元に作製したプローブを用いてラットの中枢神経系の組織由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによりクローニングすることができる。これらクローニングの個々の技術は、例えばMolecular Cloning 2nd Edt. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))等の基本書を参照することにより行うことができる。クローニングされたDNAの塩基配列の決定も、市販のシーケンスキット等を用いる通常の方法により行うことができる。

なお上記クローニング法によらなくとも、本発明のラットセマフォリンW cDNAの塩基配列の公開に伴い、当業者ならば、該cDNAの一部をプローブを用いてラットセマフォリンWの全長を容易にクローニングすることができる。

【0013】

本発明の第2の態様は、配列表の配列番号：2に記載の塩基配列からなるDN

Aであって、配列番号：1に記載された塩基配列の最長のオープンリーディングフレームである。

【0014】

本発明の第3の態様は、配列表の配列番号：3に記載のアミノ酸配列からなる本発明の代表的なタンパク質、ラットセマフォリンWである。

該ラットセマフォリンWは、セマフォリンに特徴的な配列であるセマフォリンドメインを有するが、これは配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第62位から第567位までに相当する。

また該ラットセマフォリンWはN末端にシグナル配列を有するが、これは配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第1位から第39位までに相当する。該シグナル配列は膜に移行する際にプロセッシングを受けて除去される。

【0015】

次に該ラットセマフォリンWの調製法であるが、たとえばクローニングされたラットセマフォリンW cDNAを、pET、pCDM8等の公知の発現ベクターに連結した後、適当な宿主に導入することにより発現・生産することができる。宿主としては、原核生物細胞または真核生物細胞のいずれでもよく、例えば大腸菌株や動物細胞株は既に広く普及しており入手は可能である。例えば動物細胞宿主としては、COS-1、COS-7、CHO細胞等が挙げられる。発現プラスミドを用い適当な動物細胞宿主を形質転換するには、リポフェクチン法(Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 84,7413-7417 (1987))等の公知の方法を用いればよい。形質転換された細胞の細胞膜にセマフォリンWは局在しており、この細胞膜画分はそのまま種々のアッセイに使用され得る程度のセマフォリンWを含んでいる。従って、この細胞膜画分を用いてセマフォリンWの種々の活性測定を容易に行うことができる。

またセマフォリンWは、後述の本発明の第23態様のセマフォリンW認識抗体を用いたアフィニティー精製、あるいは通常のカラムクロマトグラフィー等の方法により精製することができる。

【0016】

本発明の第4の態様は、配列表の配列番号：4に記載の塩基配列を有するDN

Aであって、本発明の代表的なタンパク質、ヒトセマフォリンWをコードするcDNAである。該DNAは、例えば配列表の配列番号：1に記載されたラットセマフォリンWの塩基配列を基にプライマーを合成し、ヒトの中枢神経系の組織由来のmRNAより調製したcDNAを鋳型にしてPCR反応を行うことにより（例えば McPhersonらの編纂による PCR (1991) IRL Press を参照）、あるいは実施例3に示したのと同様の方法でヒトcDNA又はヒトゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、クローニングすることができる。クローニングされたDNAの塩基配列の決定も、本発明の第1態様のDNAと同様の手法により行うことができる。また実施例4に記載したように、ESTクローン（米国ジェノムシステムズ社製）を用いてクローニングすることもできる。

ここで「配列表の配列番号：4に記載の塩基配列」は、ヒトセマフォリンWの部分的な塩基配列である。しかし当業者にとっては上記と同様の方法により、該塩基配列の一部又は全部よりなるDNAをプローブに用いてヒトcDNA又はヒトゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、あるいはPCR法を用いることなどによって、容易にヒトセマフォリンW cDNAの全長をクローニングし、塩基配列を決定することが可能である。従って、本発明の第4態様のDNAの具体例として、このヒトセマフォリンW cDNAの全長が挙げられる。

【0017】

本発明の第5の態様は、配列表の配列番号：5に記載の塩基配列を有するDNAであって、配列番号：4に記載された塩基配列の連続してアミノ酸をコードする領域であり、ヒトセマフォリンWのオープンリーディングフレームの一部分である。

【0018】

本発明の第6の態様は、配列表の配列番号：6に記載のアミノ酸配列を有する本発明の代表的なタンパク質、ヒトセマフォリンWの一部分である。このアミノ酸配列の第1位から第207位までは、セマフォリンドメインの一部を形成する。該ヒトセマフォリンWの発現及び精製は、本発明の第3態様のラットセマフォリンWと同様の手法により行うことができる。

【0019】

本発明の第7の態様は、配列表の配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、セマフォリンドメインを有するタンパク質をコードするDNAである。

ここで「配列表の配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNA」とは、セマフォリン間でよく保存された7アミノ酸からなる配列 (Gln(またはArg)-Asp-Pro-Tyr-Cys-Ala (またはGly)-Trp) に類似の配列 (Gln-Asp-Pro-Val-Cys-Ala-Trp) を一部配列としてコードするDNA「T09073」の配列情報をもとに、その全塩基配列を決定したDNAであり、配列表の配列番号：1に記載されたラットセマフォリンWの塩基配列の第1561位から第1756位に、また配列表の配列番号：4に記載されたヒトセマフォリンWの塩基配列の第407位から第602位に相当するDNAである。

また、ここで「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」DNAとは、例えば実施例3に記載されているように、ホルムアミド濃度：45%(v/v)、塩濃度：5×SSPE、温度：42℃程度の条件下でハイブリダイズさせ、塩濃度：2×SSPE、温度：42℃程度の条件下で洗浄した場合において、配列番号：7のDNAとハイブリダイズするようなDNAを指す。

【0020】

これらDNAは、配列番号：7のDNAとのハイブリダイゼーション等によりクローニングされるものであるが、具体的には、例えば TINS, 15, 319-323(1992)およびこの引用文献記載の方法によって行うことができ、さらに具体的には例えば以下の方法により行うことができる。

即ち、配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNAをプローブとして、各種動物の組織から調製したcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより行うことができる。スクリーニング方法としては、例えば、実施例3に示したような方法が挙げられる。また、cDNAライブラリーとしては成人の中枢神経系の組織由来のcDNAライブラリーを用いることが好ましく、更に好ましくは海馬、線条体、小脳由来のcDNAライブラリーを用いる。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば前述のように実施例3に示した条件、あるいは TINS, 15, 319-323(1992)およびこの引用文献等に記載されている

条件が挙げられる。

【0021】

また、本発明の第7態様のDNAは、「セマフォリンドメインを有するタンパク質をコードするDNA」でもある。ここで「セマフォリンドメイン」とは、例えば Cell, 75, 1389-1399(1993) または Neuron, 14, 941-948(1995)に記載された既知の10個のセマフォリン (G-Sema I, T-Sema I, D-Sema II, H-Sema III, C-Collapsin, Sem A, Sem B, Sem C, Sem D, Sem E) のいずれか1つのセマフォリンドメインを構成するアミノ酸と20%以上が一致する300-600のアミノ酸残基からなる配列で構成されるドメインをいう。特に好ましいものとしては、30%以上のアミノ酸が一致するセマフォリンドメインを有するものが挙げられる。ここで、アミノ酸の一致は、例えば日立ソフトウェアエンジニアリング社製のDNASIS Ver.2.0を、ktup=1, cutoff=1の条件で比較することでなされる。さらに好ましくは、既知の10個のセマフォリンのセマフォリンドメインにおいて保存されている13個のシステイン (このシステインは例えば Neuron, 14, 941-948(1995)の942頁図1においてマークされているものが挙げられる) のうち、10個以上が保存されたものが挙げられ、特に12個以上が保存されたものが好ましい。

このような本発明の第7の態様のDNAの具体例としては、配列表の配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする未知のセマフォリン遺伝子、あるいは哺乳類、鳥類の全てのセマフォリンW遺伝子が挙げられる。哺乳動物間あるいは哺乳類と鳥類の間では相同な遺伝子なら配列は非常に似ており、通常75%以上、多くは90%以上の塩基配列が共通である。従って、該哺乳類、鳥類全てのセマフォリンW遺伝子は、本発明の第7の態様のDNAに該当する。

【0022】

本発明の第8の態様は、本発明の第7態様のDNAがコードするタンパク質である。すなわち、配列表の配列番号：7に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、かつセマフォリンドメインを有するものである。これらタンパク質の発現

及び精製は、本発明の第3態様のタンパク質と同様の手法により行うことができる。

【0023】

なお、これら本発明の第7態様のDNA及び本発明の第8態様のタンパク質は、本発明の核心をなすセマフォリンWの発見があつて初めて見出されるものである。そしてセマフォリンWの発見さえあれば、後は上述の如き従来法により容易に本発明の第7態様のDNAをクローニングし、本発明の第8態様のタンパク質を発現できる状況にある。従つて、セマフォリンWの発見に付随して見出される本発明の第7態様のDNA及び第8態様のタンパク質もまた、本発明の本質を保持するものとして本発明の範疇に含まれる。

【0024】

本発明の第9の態様は、本発明の第1態様のDNA（ラットセマフォリンWのDNA）又は本発明の第4態様のDNA（ヒトセマフォリンWのDNA）とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、中枢神経再生阻止活性を有するタンパク質をコードするDNAである。

該DNAは、配列表の配列番号：1に記載のDNA又は配列番号：4に記載のDNAにハイブリダイズするものであるが、具体的なクローニングは、たとえば配列番号：1又は配列番号：4に記載のDNAの一部又は全部をプローブに用いて各種動物の組織から調製したcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより行うことができる。具体的なスクリーニング方法等は、本発明の第7態様のDNAと同様にして行うことができる。また、「ストリンジントな条件」も、本発明の第7態様のDNAと同様の条件を使用することができる。

【0025】

「中枢神経再生阻止活性」は、本発明の第3態様のタンパク質と同様の手法により該DNAを発現させた発現産物を用いて測定することができる。測定法として、*in vivo* では元々再生阻止因子が大量に存在しているためこの再生阻止活性を測定するには適当ではなく、通常*in vitro*の方法を用いて測定を行う。これらは*in vitro*の方法であるため各々に特徴があり、従つて複数の方法を用いて活

性を確認することが好ましい。以下、具体的方法について述べる。

【0026】

セマフォリンWは膜タンパク質であるため、セマフォリンW遺伝子で形質転換された細胞の細胞膜にセマフォリンWは局在している。従って形質転換された細胞の膜画分を材料に使うことでセマフォリンWの活性を容易に測定できる。

セマフォリンWの活性は種々の方法で測定が可能であるが、代表的な方法としては、神経の成長円錐に対する退縮活性 (M.Igarashi et al Science vol.259 p p77-79(1993))、あるいは神経の伸長阻止活性 (J.A.Davies et.al. Neuron vol .2 pp11-20(1990)やM.Bastmeyer J.Neurosci.vol.11 pp626-640(1991)など) などがある。成長円錐阻止活性の測定方法は文献 (M.Igarashi et al Science vol .259 pp77-79(1993)) に詳しく述べられているが、簡単には、セマフォリンWを発現する細胞をホモゲナイズし、細胞膜の画分を含むホモジェネートを用いる方法、あるいは精製した膜画分を用いる方法 (E.C.Cox et.al. Neuron vol.2 pp31-37(1990))、あるいは膜画分から抽出した蛋白質をリボソームに再構成したものを材料にする方法 (C.E.Bandtlow Science vol.259 pp80-84(1993))などが可能である。これらを材料にして実際に成長円錐の退縮活性を測定するには、ラミニンやコラーゲン、ポリリジン、ポリオルニチンといったような神経突起の伸長と成長円錐の形成を促進する物質をコーティングした容器の中で通常の条件で培養した神経細胞 (Bankerらの編纂による *Culturing Nerve Cells* MIT Press(1991) など) に対し、先に述べたような形状のセマフォリンW蛋白質を添加することによって行う。添加後、成長円錐の退縮が起こるのに十分な時間 (通常添加後30分から1時間) が経過した時点でこの神経細胞を1%グルタルアルデヒドなどで固定し、顕微鏡下で退縮を起こした成長円錐の数を計数する。このときセマフォリンWを発現していない細胞を出発材料にしてセマフォリンW発現細胞を用いたときと全く同様にして調整した試料を対照として観察することが重要である。通常、試料の平均化は試料内に含まれる総蛋白量によって行う。一方、突起伸長阻害活性を測定するには上記と同様にして調整したセマフォリンWをマイクロポアフィルターやガラスやプラスチック製の培養容器の表面の一部分にコーティングし、通常の条件で培養した神経細胞が、このコーティング面上では接着できな

いこと、突起の伸長速度が非常に低下すること、あるいはコーティング面の外からコーティング面に向かって伸長する神経突起がコーティング面との境界に達しても、停止したり、回避したりして面内に侵入できないことなどを指標とする。コラーゲンゲル中でセマフォリンWを発現する細胞の塊と神経細胞とを同時に培養した場合には、伸長する神経突起がセマフォリンW発現細胞の塊の中に侵入できないことも指標とできる (A.Sophia et. al. Cell vol.81 pp621-629(1995))。これらの活性測定実験に用いる神経細胞は脊髄や大脳皮質運動野の運動神経などの中枢神経が好ましいが、中枢神経再生阻止因子として知られている NI35/250 が、末梢神経である上頸神経節や後根神経節の神経細胞に対しても突起伸長阻止や成長円錐退縮などの活性を有することが判明しているため (J. Cell Biol., 106, 1281-1288 (1988)、Science, 259, 80-83 (1993))、該末梢神経を用いることも可能である。

本発明の第9態様のDNAの具体例としては、本発明の第7態様のDNAと同様、ほ乳類・鳥類全てのセマフォリンW遺伝子が挙げられる。

【0027】

本発明の第10の態様は、本発明の第9態様のDNAがコードするタンパク質である。すなわち、本発明の第1態様又は第4態様のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、かつ中枢神経再生阻止活性を有するタンパク質である。これらタンパク質の発現及び精製は、本発明の第3態様のタンパク質と同様の手法により行うことができ、また中枢神経再生阻止活性の測定は、本発明の第9態様の項に記載した方法で行うことができる。

【0028】

なお、これら本発明の第9態様のDNA及び本発明の第10態様のタンパク質も、本発明の核心をなすセマフォリンWの発見があつて初めて見出されるものである。そしてセマフォリンWの発見さえあれば、後は上述の如き従来法により容易に本発明の第9態様のDNAをクローニング、発現させ、上述の如き中枢神経再生阻止活性の測定系に供することにより、該活性を有する本発明の第10態様のタンパク質を選び出すことができる。従つて、セマフォリンWの発見に付随し

て容易に見出される本発明の第9態様のDNA及び第10態様のタンパク質もまた、本発明の本質を保持するものとして、本発明の範疇に含まれる。

【0029】

本発明の第11の態様は、本発明の第3態様のラットセマフォリンW及び本発明の第6態様のヒトセマフォリンWにおいて1もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換されている、中枢神経再生阻止活性を有する誘導タンパク質をコードするDNAである。

ここで、「1もしくは複数のアミノ酸の挿入、欠失もしくは置換」は、例えば部位特異的突然変異誘発 (Methods in Enzymology, 100, 448- (1983))やPCR法 (Molecular Cloning 2nd Edt. 15 章, Cold Harbor Laboratory Press (1989)、"PCR A Practical Approach" IRL Press 200-210(1991))により、当業者ならば容易に行うことができる。また中枢神経再生阻止活性の測定は、本発明の第9態様の項に記載の方法により、同様に行うことができる。

【0030】

既知のセマフォリンの構造を比較すると、保存されたアミノ酸は大部分セマフォリンドメイン内に位置し、セマフォリンの活性発現にはこれら保存されたアミノ酸が重要であると考えられる。さらに、本発明者らが Sema III のセマフォリンドメイン内の第198位のアスパラギン酸がグリシンに置換された誘導タンパク質の成長円錐退縮活性を測定したところ、該誘導タンパク質は活性を有していなかった(後述の参考例1参照)。従ってSema IIIにおいては、第198位のアスパラギン酸が活性発現に重要であると考えられる。既知のセマフォリンにおけるこの位置に相当するアミノ酸は非常に良く保存されており、一部のセマフォリンにおいてグルタミン酸である以外は全てアスパラギン酸である。従って、Sema III以外のセマフォリンにおいても、この位置のアミノ酸が活性発現に重要であると考えられる。本発明のセマフォリンWにおいてSema IIIの第198位に相当するアミノ酸は、配列表の配列番号: 3に記載のアミノ酸配列中、第204位のグルタミン酸であると予想される。またヒトセマフォリンWにおける該アミノ酸は、204位近辺の位置にくるグルタミン酸が考えられるが、正確には、ヒトセマフォリンWのアミノ酸配列と配列番号3のラットセマフォリンWのアミノ酸配

列を最も一致するように並べた時に、ラットセマフォリンWの204位のグルタミン酸に対応する位置にくるヒト配列中のアミノ酸が該当する。

【0031】

以上の知見より、セマフォリンWの有する中枢神経再生阻止活性を、その誘導タンパク質においても残存させるためには、上記アミノ酸の挿入、欠失もしくは置換は、セマフォリン間で保存されたアミノ酸以外の部分で行うことが望ましい。特に、配列番号：3のラットセマフォリンWの204位のグルタミン酸、あるいはヒトセマフォリンWの該当アミノ酸は、改変しないことが望ましい。一方セマフォリン間で保存されたアミノ酸を置換する場合は、類似の側鎖を有するアミノ酸に置換することが望ましい。セマフォリンWの有する中枢神経再生阻止活性をさらに増強させた誘導タンパク質を作製するならば、このように保存されたアミノ酸を類似の側鎖を有するアミノ酸に置換することが好ましいかもしれない。なお、ここで「保存されたアミノ酸」とは、Cell, 75, 1389-1399 (1993)の図2、もしくは Neuron, 14, 941-948 (1995)の図1において、50%以上のセマフォリン遺伝子においてアミノ酸が同一となるような位置に存在するアミノ酸を言う。

【0032】

本発明の第12の態様は、本発明の第11態様のDNAがコードする誘導タンパク質である。すなわち、本発明の第3態様又は第6態様のタンパク質において1もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換されており、かつ中枢神経再生阻止活性を有する誘導タンパク質である。これら誘導タンパク質の発現及び精製は、本発明の第3態様のタンパク質と同様の手法により行うことができ、また中枢神経再生阻止活性の測定は、本発明の第9態様の項に記載した方法で行うことができる。

【0033】

なお、これら本発明の第11態様のDNA及び本発明の第12態様のタンパク質も、本発明の核心をなすセマフォリンWの発見があつて初めて見出されるものである。そしてセマフォリンWの発見さえあれば、後は上述の如き従来法により適宜種々の誘導タンパク質を調製し、上述の如き中枢神経再生阻止活性の測定系

に供することにより、該活性を有する本発明の第12態様の誘導タンパク質を選び出すことができる。従ってセマフォリンWの発見に付随して容易に見出されるものである本発明の第11態様のDNA及び第12態様のタンパク質もまた、本発明の本質を保持するものとして、本発明の範疇に含まれる。

【0034】

本発明の第13の態様は、本発明の第3態様ラットセマフォリンW又は本発明の第6態様のヒトセマフォリンにおいて1もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換されている、中枢神経再生促進活性を有する誘導タンパク質をコードするDNAである。

これらDNAは、本発明の第11態様のDNAと同様の手法により得ることができる。また、中枢神経再生促進活性の測定は、例えば後述の本発明の第24態様のスクリーニング法により、測定することができる。

これらタンパク質の具体例として、セマフォリンWの有する中枢神経再生阻止活性を消失させた誘導タンパク質が考えられる。活性を有さない誘導タンパク質がセマフォリンWの代わりに該セマフォリンWのリセプターに結合することにより、上述の中枢神経再生促進活性を発揮することが考えられる。本発明の第11の態様の項に記載したように、セマフォリンの活性部位はセマフォリンドメイン内に、そしてラットセマフォリンWにおいてはおそらく第204位のグルタミン酸に存在していることが示唆されている。従って、セマフォリンW活性を、その誘導タンパク質において消失させるためには、上記アミノ酸の挿入、欠失もしくは置換は、該セマフォリンドメイン内の保存されたアミノ酸に対して、好ましくは第204位のグルタミン酸に対して行うのが望ましい。その際、もとのアミノ酸と異なった性質の側鎖を有するアミノ酸への置換が望ましい。ヒトなどラット以外のセマフォリンWにおいてもラットにおける204位に相当する位置にあるアミノ酸、即ち該セマフォリンWのアミノ酸配列をラットセマフォリンWと最も一致するように並べた場合、ラット204位に相当する位置にあるアミノ酸に対して改変を行うのが望ましい。

【0035】

本発明の第14の態様は、本発明の第13態様のDNAがコードする誘導タン

パク質である。すなわち、本発明の第3態様又は第6態様のタンパク質において1もしくは複数のアミノ酸が挿入、欠失もしくは置換されており、かつ中枢神経再生促進活性を有する誘導タンパク質である。これら誘導タンパク質の発現及び精製は、本発明の第3態様のタンパク質と同様の手法により行うことができ、また中枢神経再生促進活性の測定は、本発明の第13態様の項に記載した方法で行うことができる。

【0036】

なお、これら本発明の第13態様のDNA及び本発明の第14態様のタンパク質も、本発明の核心をなすセマフォリンWの発見があって初めて見出されるものである。そしてセマフォリンWの発見さえあれば、後は上述の如き従来法により適宜種々の誘導タンパク質を調製し、上述の如き中枢神経再生促進活性の測定系（スクリーニング系）に供することにより、該活性を有する誘導タンパク質を容易に選り出すことができる。従ってセマフォリンWの発見に付随して容易に見出されるものである本発明の第13態様のDNA及び第14態様のタンパク質もまた、本発明の本質を保持するものとして、本発明の範疇に含まれる。

【0037】

本発明の第15の態様は、ヒトcDNAライブラリー又はヒトゲノムライブラリーからクローニングされるDNAであって、本発明の第1態様のラットセマフォリンWDNA又は本発明の第4態様のヒトセマフォリンWDNAの全部又は一部、又はその相補鎖の全部又は一部からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAである。

クローニングの方法は、例えば Molecular Cloning, 2nd Edt., Cold Harbor Laboratory Press (1989) 等に詳しく述べられており、具体的には、ハイブリダイゼーションを用いる方法、PCRを用いる方法等が挙げられる。ライブラリーとしてはヒト由来のゲノム性ライブラリーを用いることが好ましく、成人の中枢神経由来のcDNAライブラリーを用いることもできる。ハイブリダイゼーションを用いる方法の場合は、例えば TINS, 15, 319-323 (1992) 及びこの引用文献等に従い行うことができる。またPCR法を用いる場合は、McPherson らの編纂による PCR (1991) IRL Press 等に従い行うことができる。

クローニングされるDNAはヒトセマフォリンWの遺伝子であるが、その全長のDNAに限らず、そのうちの200塩基以上からなる断片DNAも含む。本発明の第15態様のDNAの具体例としては、5'、3'転写調節領域、エキソンのノンコーディング配列、イントロンなどを含む染色体DNAが挙げられる。これらアミノ酸をコードしない配列も、後述のアンチセンス技術を用いて薬剤を開発する場合などに非常に有用である。

なお、これら本発明の第15態様のDNAもまた、本発明のセマフォリンWの発見に付随して容易に見出されるものであるため本発明の範疇に含まれるものである。

【0038】

本発明の第16の態様は、本発明の第1、第2、第4、第5、第7、第9、第11、第13又は第15態様のDNAを発現する発現プラスミドである。また、本発明の第17の態様は、該発現プラスミドによって形質転換された形質転換体である。また本発明の第18の態様は、該形質転換体を、該発現プラスミドの発現可能な条件下で培養することを特徴とする組換タンパク質の生産方法である。これら発現プラスミド及び形質転換体の作製方法、あるいは組換タンパク質の生産方法は、本発明の第3の態様の項に記載したように、全て当業者にとって周知の方法である。

【0039】

本発明の第19の態様は、本発明の第3、第6、第8、第10、第12又は第14態様のタンパク質の全部又は一部を含むポリペプチドである。ここで、「...タンパク質の全部又は一部」とは、各態様のタンパク質のアミノ酸配列の全部、又は十数〜数十の配列からなるポリペプチドを指し、好ましくは10〜20個程度のアミノ酸配列からなるポリペプチドを指す。該ポリペプチドは、10〜20個程度の短いものであればペプチド合成装置により合成することができ、長いものであれば通常の遺伝子工学的手法により調製されたDNAを、上述の動物細胞等により発現させることにより得ることができる。なお、このようにして作製されたポリペプチドを、通常の方法により修飾することも可能である。

【0040】

本発明の第20の態様は、本発明の第19態様のポリペプチドのうち、配列表の配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第204位のグルタミン酸、あるいは該グルタミン酸の位置に相当するアミノ酸を含有することを特徴とするポリペプチドである。本発明の第11及び第13態様の項に記載したように、配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第204位のグルタミン酸は、セマフォリンWの活性発現に重要であると考えられるアミノ酸である。ここで「該グルタミン酸の位置に相当するアミノ酸」とは、本発明の第6、第8、第10、第12又は第14態様のタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：3に記載のラットセマフォリンWのアミノ酸配列と最も一致するように並べた場合、ラットセマフォリンWの204位に相当する位置にあるアミノ酸を指す。従って、「該グルタミン酸の位置に相当するアミノ酸を含有することを特徴とするポリペプチド」とは、このラット204位に相当する位置にあるアミノ酸を有し、かつその前後のアミノ酸からなるポリペプチドを指す。この本発明の第20態様のポリペプチドの用途については、本発明の第27態様の項を参照されたい。

【0041】

本発明の第21の態様は、本発明の第1、第4、第7、第9又は第15態様のいずれかのDNAの全部又は一部に相補的な配列を有するDNA又はRNA、あるいはそれらの化学的修飾体である。

ここで、「・・・相補的な配列を有するDNA又はRNA」とは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、もしくは、アンチセンスRNA又はアンチセンスDNAなどと呼ばれるものを指し、合成機を用いて人工的に合成したり、通常と逆の向き（すなわちアンチセンスの向き）に遺伝子を発現させることなどによって得られるアンチセンス鎖である。これらアンチセンスオリゴヌクレオチドは、後述の第22態様の項に記載したようなセマフォリンWの発現を抑制する目的で使用される他、*in situ* ハイブリダイゼーション等の研究用試薬としても有用である。

また、ここで「化学的修飾体」とは、具体的にはアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内への移行性または細胞内での安定性を高めることができる化学的修飾体を表し、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホトリエステル、アルキルホスホナート、アルキルホスホアミデート等の誘導

体 ("Antisense RNA and DNA" WILEY-LISS刊 1992 P.1-50、J.Med.Chem. 36, 1923-1937(1993))が挙げられる。この化学的修飾体は、同文献等に従って調製することができる。

【0042】

本発明の第22の態様は、本発明の第3、第6、第8又は第10態様のいずれかのタンパク質の発現を抑制することを特徴とする、アンチセンスDNA又はRNA、あるいはこれらの化学的修飾体である。

通常の遺伝子の転写によって生産されるmRNAはセンス鎖であるが、アンチセンス鎖であるアンチセンスDNA、RNAは、細胞内でセンス鎖mRNAに結合し、該遺伝子の発現を抑制することができる。従って、該相補的な配列を有するDNA又はRNA、あるいはその化学的修飾体は、本発明の第3、第6態様のセマフォリンW等の発現を抑制することができる。

作製したアンチセンスオリゴヌクレオチドが目的の抑制効果を有しているか否かは、セマフォリンWを発現する細胞に外からアンチセンスオリゴヌクレオチドそのものを直接導入するか、或いは転写によって該アンチセンスオリゴヌクレオチドを生成する遺伝子を導入し、該セマフォリンWの発現量が減少するか否かを指標にして、容易に見い出すことができる。

この抑制効果を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、上記各態様のセマフォリンcDNAのコーディング部分、5' ノンコーディング部分のいずれの部分に相補的な配列であってもよいが、好ましくは転写開始部位、翻訳開始部位、5' 非翻訳領域、エクソンとイントロンとの境界領域もしくは5' CAP領域に相補的配列であることが望ましい。

【0043】

本発明の第23の態様は、本発明の第3、第6、第8、第10、第12態様のいずれかのタンパク質又は本発明の第19、第20態様のいずれかのポリペプチドに対する抗体である。該抗体は、マウスやウサギを用いて、例えばカレントプロトコルズ イン イムノロジー-2.4.1-2.6.6 頁(1992刊、ジェー・イー・コリガン編集)に記載された方法により、容易に作製することができる。このような方法によって作製した抗体は、セマフォリンWに対する中和活性を有している

かもしれない。これら中和抗体は、本発明の第24態様の項に記載のスクリーニング法により、容易に選び出すことができる。

【0044】

なお、上述の如き本発明の第19又は第20態様のポリペプチド、本発明の第21又は第22態様のDNA又はRNAあるいはその化学的修飾体、本発明の第23態様の抗体のいずれも、本発明のセマフォリンWの発見さえあれば当業者にとっては容易に調製することができる技術状況であるため、本発明の範疇に含まれるものである。

【0045】

本発明の第24の態様は、本発明の第3、第6、第8、第10又は第12態様のいずれかのタンパク質を用いることを特徴とする、セマフォリンW阻害物質のスクリーニング方法である。ここで、「セマフォリンW阻害物質」とは、セマフォリンWの有する中枢神経再生阻止活性を阻害する物質を指す。

該スクリーニングは、本発明の第9態様の項に述べたセマフォリンW活性測定系に被験物を添加することによって行う。即ち、セマフォリンW活性測定実験において培養の期間を通して或いはその一時期だけ被験物を培養液に添加することによってセマフォリンWの活性が阻害されることを指標とする。また、同濃度の被験物単独では神経細胞の生存、突起伸長などに対して影響しないことを確認することも重要である。この両者が満たされた場合、この被験物をセマフォリンW阻害物質と認定することができる。被験物はあらかじめ水溶液であることが好ましいが、DMSOなどの有機溶媒を溶媒として用いることもできる。いずれの場合も神経細胞に対する溶媒の影響を除くために、加える体積は最小限にすることが大切であり、具体的には培養液に対して等量以下、好ましくは1/10以下、更に好ましくは1/100以下になるようにする。このようにして得られたセマフォリンW阻害物質は、後述の本発明の第27態様の項に記載したように、中枢神経の再生治療促進剤として用いることができる。

【0046】

本発明の第25の態様は、本発明の第24態様のスクリーニング方法を用いて得られるセマフォリンW阻害物質である。該阻害剤は、セマフォリンWの活性を

阻害する物質であればその構造・形状等は問わない。

【0047】

本発明の第26の態様は、本発明の第14態様の誘導タンパク質、第19態様又は第20態様のポリペプチド、あるいは第23態様の抗体からなる、第25態様のセマフォリンW阻害物質である。すなわち、本発明の第14態様の誘導タンパク質、第19態様又は第20態様のポリペプチド、第23態様の抗体のうち、セマフォリンWの有する中枢神経再生阻止活性を阻害する効果を有するものである。これら阻害物質は、本発明の第24態様のスクリーニングに供することにより、容易に選り出すことができる。

【0048】

本発明の第27の態様は、本発明の第22態様のDNA又はRNA、あるいはそれらの化学的修飾体、第25又は第26態様のセマフォリンW阻害物質の一つ又はそれ以上を含有することを特徴とする、中枢神経の再生治療促進剤である。本態様は「中枢神経の再生治療」という用途に係わるものであるため、以下、具体的な用法・容量等につき説明する。

【0049】

1) アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその化学的修飾体

本発明の第22態様の項に記載したように、本発明の第22態様のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体を用いてセマフォリンW遺伝子の発現を抑制することができるため、セマフォリンタンパク質の存在量を減らし、中枢神経の再生治療を促進することができると思われる。治療方法としては、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体をそのまま投与方法、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞内で生産する方法がある。

【0050】

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体をそのまま投与方法において、このアンチセンスオリゴヌクレオチドの好ましい長さとしては、例えば5-200塩基のものが挙げられ、さらに好ましくは8-25塩基が挙げられ、特に好ましくは12-25塩基のものが挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体を安定化材、緩衝液、溶媒などと混合して

製剤化した後、投与時には抗生物質、抗炎症剤、麻酔薬などと同時に用いることもできる。こうして調製された製剤は様々な方法で投与可能であるが、好ましくは神経の障害の著しい部位に局所的に投与される。神経の再生は通常数日から数カ月を要するものであり、その間、投与は連日または数日から数週間おきになされる。また、この様な頻回の投与を避けるために徐放性のミニペレット製剤を調製し患部近くに埋め込むことも可能である。あるいはオスモチックポンプなどを用いて患部に連続的に徐々に投与することも可能である。通常投与量は作用部位における濃度が 0.1nM - $10\mu\text{M}$ になるように調製する。

一方、アンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞内で生産する方法において、このアンチセンスオリゴヌクレオチドの好ましい長さとしては、例えば100塩基以上が挙げられ、好ましくは300塩基以上が挙げられ、さらに好ましくは500塩基以上が挙げられる。

【0051】

遺伝子の患者への導入方法としては直接生体内の細胞に遺伝子を導入する *in vivo* 法、及び体外である種の細胞に遺伝子を導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo* 法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48 (1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの引用文献等）が、*in vivo* 法がより好ましい。

in vivo 法としては、組換えウイルスを用いる方法及びその他の方法（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48 (1994)、実験医学増刊、12(15)、全頁(1994)、及びこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

組換えウイルスを用いる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のウイルスゲノムにセマフォリン遺伝子を組み込んで生体内に導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、リポソーム法、リポフェクチン法等が挙げられ、特にリポソーム法が好ましい。

ex vivo法としては上記方法以外にマイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等も用いることができる。

患者への投与方法は、治療目的の疾患、症状などに応じた適当な投与経路により投与される。例えば、静脈、動脈、皮下、筋肉内等に投与するか、または神経などの疾患の対象部位に直接投与することができる。例えば、脊髄に感染させると脊髄で特異的にセマフォリン遺伝子の発現が抑制される。通常、本願のアンチセンスオリゴヌクレオチドの発現は数日から数カ月持続し、この1回の感染で神経の再生が十分に起こる。発現が弱いときは、再感染することもできる。in vivo方法により投与される場合は、製剤形態（例えば、液剤など）をとりうるが、一般的には有効成分であるセマフォリン遺伝子を含有する注射剤と等とされ、必要に応じて、慣用の担体等を加えても良い。また、セマフォリン遺伝子を含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）-リポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリポソーム製剤の形態とすることができる。

製剤中のセマフォリン遺伝子の含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調節することができるが、通常セマフォリン遺伝子として、0.0001-100mg、好ましくは0.001-10mgであり、これを数日ないし数カ月に1回投与するのが好ましい。

【0052】

2) セマフォリンWの誘導タンパク質

本発明の第13態様及び第14態様の項に記載したように、セマフォリンWの有する中枢神経再生阻止活性を消失させた誘導タンパク質を作製することができ、該誘導タンパク質を生体内に投与することにより、セマフォリンWの代わりに該セマフォリンW誘導タンパク質がセマフォリンWのリセプターに結合し、その結果、セマフォリンWの活性が抑制され、中枢神経の再生治療が促進されることが考えられる。

治療においては該セマフォリンWの誘導タンパク質を安定化剤、緩衝液、希釈液と共に製剤化して患者に投与する。投与は様々な方法で可能であるが、好ましくは病床部位に局所的に投与する。神経の再生には通常数日から数カ月を要する

ので、その間セマフォリンWの活性を抑制するために1回もしくは2回以上投与する。2回以上投与するときは連日あるいは適当な間隔をおいて繰り返し投与することが望ましい。注射によって中枢神経系、例えば脊髄内に投与するときは、一回当たり数百 μg から2g、好ましくは数十mg以下を用いる。投与回数を減らすために徐放性製剤を利用したり、オスモティックポンプなどで長期間に渡って少量ずつ投与する方法も可能である。あるいは該セマフォリンW誘導タンパク質を発現する細胞を生体内に移植することによっても可能である。

【0053】

3) セマフォリンWのポリペプチド

本発明の第19又は第20態様のペプチドは、セマフォリンWの受容体への結合を阻害することによって、セマフォリンWの有する中枢神経再生阻止活性を抑制し、その結果、中枢神経の再生を促進することができる。このような効果を有するポリペプチドとして、例えば本発明の第20態様の項に記載したように、配列番号：3のラットセマフォリンWの204位のグルタミン酸、或いは該グルタミン酸に該当するアミノ酸を含有することを特徴とするポリペプチドが挙げられる。なお阻害の様式は、競争阻害、非競争阻害、不競合阻害、アロステリック阻害のいずれの様式であるかを問わない。

これらポリペプチドの製剤化、投与方法、投与量については上記「2) セマフォリンWの誘導タンパク質」の項を参照されたい。

【0054】

4) セマフォリンWの抗体

セマフォリンWの活性を中和する中和抗体を生体内に投与することにより、セマフォリンWの活性が阻害され、中枢神経の再生治療が促進されることが考えられる。

該中和抗体の製剤化、投与方法、投与量については上記「2) セマフォリンWの誘導タンパク質」の項に記載の通りであるが、別の方法として、Nature, 343, 269-272(1990)に記載されているように、モノクローナル抗体を産生する細胞を直接中枢神経系に移植する方法も可能である。

【0055】

なお、上記本発明の第24態様のスクリーニング法は、中枢神経再生阻止活性を有する本発明の代表的なタンパク質、セマフォリンWの発見に伴って初めて可能になったことである。そしてセマフォリンWの発見さえあれば、後は、上述の如き手法により容易にスクリーニングが実施できる状況にある。またスクリーニングの実施により、セマフォリンWの有する中枢神経再生阻止活性を阻害する本発明の第25又は第26態様のセマフォリンW阻害物質を容易に選別することができる。そして該阻害物質、あるいは前述の如きセマフォリンWの発現を制御するアンチセンスDNA、RNA又はその化学的修飾体を医薬成分として製剤化を行うことにより、本発明の第27態様の中枢神経の再生治療促進剤を調製することができる。従ってこれらは全て、本発明の本質を有するものとして、本発明の範疇に含まれる。

【0056】

本発明の第28の態様は、本発明の第3、第6、第8、第10又は第12態様のタンパク質の一つ又はそれ以上を含有することを特徴とする、末梢神経の伸長抑制剤である。これら各態様のタンパク質は、中枢神経再生阻止活性を有することが予想されるが、同時に末梢神経にもセマフォリンWに対する受容体が発現している可能性があること、また、他のセマフォリンに対する受容体がセマフォリンWに対しても反応する可能性があることなどから、末梢神経に対してもその伸長を抑制することが予想される。従って末梢神経の伸長を抑制することにより、アトピー性皮膚炎、疼痛等の治療薬となることが考えられる。

これらタンパク質の製剤化、投与法、投与量については上記「2）セマフォリンWの誘導タンパク質」の項を参照されたい。

【0057】

本発明の第29の態様は、本発明の第1、第4、第7又は第9態様のDNAのいずれかを有するか、あるいはいずれかをノックアウトさせたトランスジェニック動物である。

本発明のセマフォリンWの遺伝子情報を持ってすれば、以下の文献（ビー＝ホーガンらの編纂によるマニピュレーションオブマウスエンブリオ 1986年コールドスプリングハーバーラボラトリー、相澤慎一著 ジーンターゲッティング 19

95年 羊土社、など)で明らかなように、現在の技術レベルでは当該領域の研究者にとって本発明の第1、第4、第7又は第9態様の遺伝子を発現するトランスジェニック動物を作製することはいとも簡単であり、こうして得られるトランスジェニック動物も当然のこととして本発明に含まれるものである。このようにして得られたトランスジェニック動物は医薬品開発のためのモデル動物として、あるいは医薬品のスクリーニング用の動物として非常に有用である。さらに、本発明の第1、第4、第7、第9態様の遺伝子を欠失した動物いわゆるノックアウト動物は当該遺伝子を有しないのが特徴であるが、文献に述べられているようにあるいは当該領域の研究者の常識として、本発明のセマフォリンWの遺伝子情報を利用して初めて作成が可能なものであり、従って本発明に含まれることは言うまでもない。

【0058】

なお、上に述べたようにセマフォリンWは中枢神経の再生に関する生体内の重要な機能を担っているが、一方で、セマフォリン遺伝子はそれ以外の免疫抑制作用などの未知の機能を有している可能性も指摘されており(Cell, 75, 1389-1399 (1993))、該セマフォリンWの遺伝子発現、蛋白の分布、機能などを調べることは当該領域の研究にとって、あるいは神経疾患などの患者の診断にとって非常に重要であり、本発明はかかる目的のために利用可能な遺伝子プローブ、抗体、組換タンパク質、トランスジェニック動物なども提供することができる。

【0059】

【実施例】

基本的な実験方法はManiatisらによって編纂された Molecular Cloning 2nd Edt. (Cold Harbor Laboratory Press, 1989), Ausubelらによって編纂された Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley & Sons, 1987) および東京大学医科学研究所制癌研究部編纂の細胞工学実験プロトコル(秀潤社、1991)などの多くの出版物に詳しく記載されている。尚、本発明は以下の実施例にのみ限定されるものでなく、本発明の技術分野における通常の変更ができることは言うまでもない。

【0060】

実施例 1

新規セマフォリン遺伝子のデータベースからの検索

ナショナルセンター フォー バイオテクノロジー リサーチ（アメリカ合衆国メリーランド州ベセスダ）のディービーイーエスティー（dbEST）データベースを用い、既知のセマフォリン遺伝子に於いてよく保存されているアミノ酸配列をコードしているDNA配列を検索した。その結果、T09073が既知のセマフォリン遺伝子間で非常に良く保存された7個のアミノ酸からなる配列（Gln(またはArg)-Asp-Pro-Tyr-Cys-Ala(またはGly)-Trp)と似た配列であるGln-Asp-Pro-Val-Cys-Ala-Trpを一部配列としてコードすることを見い出した。しかしながら、この配列は364bpと短く、また解読されていない塩基が有り、読み枠も決定できないなどの理由から、目的とする新規セマフォリン遺伝子の一部であるとは結論できなかった。また、この配列を有する遺伝子の詳しい発現分布も不明であった。そこで、まずこの遺伝子の発現分布を調べ、主に成体の中枢神経系に発現しているという本発明の目的にかなうものであることを確認した後、遺伝子の全長をクローニングし、新規セマフォリン遺伝子であることを判断することにした。

【0061】

実施例 2

T09073を有する遺伝子の発現分布

上記T09073を一部配列として有する遺伝子の発現分布をノーザン法により調べた。T09073はヒト小児脳のcDNAライブラリー由来の配列としてデータベースに登録されていることからヒトの遺伝子配列であると考えられるが、ノーザン解析は試料の調製の容易さを考えラットを対照とした。成体と胎児のラットの種々の組織からのRNAの調製は、エージーピーシー法（辻孝、中村敏一；実験医学1991年9巻 1937-1940頁、エフ・エム・アウスベルら編 カレントプロトコルズ インモレキュラーバイオロジー1989年 4.2.4- 4.2.8頁（グリーンアソシエイツ アンドウィリーインターサイエンス社））により行った。簡単に述べると、切り出した組織1g当たり10mlの変性溶液（4Mグアニジンチオシアン酸、25mMクエン酸ナトリウム（pH7.0）、0.5%サルコシル、0.1M2-メルカプトエタノール）を加えポリトロンホモゲナイザーを用いて素早くホモゲナイズした。その後、0.1 容の

2M酢酸ナトリウム (pH4.0)、一容の水飽和フェノール、0.2 容のクロロホルムーイソアミルアルコール(49:1)を加えて激しく攪拌した後、遠心して水層を分取し、イソプロピルアルコールを等容加えて -20℃で 1時間放置した。遠心で沈殿を回収し、再び1g組織当たり 2-3mlの変性溶液に溶解、等容のイソプロピルアルコールを加え -20℃ 1時間静置した後、RNAを遠沈した。75% のエチルアルコールで沈殿を洗い軽く乾燥させた後適当な体積の水に溶解した。

続いて、以下に述べる通常の方法でRNAの電気泳動とノーザンブロッティングを行った。まず、様々な組織から調製したRNAをホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲル中で電気泳動した。そのゲルを50mMNaOHで20分間振とうした後、10×SSPE(ここで1×SSPEとは0.15M 塩化ナトリウム、10mMリン酸二水素ナトリウム、1mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムの混合物をpH7.0 に調製したものを表す) 中で40分間振とうした。その後、RNAを毛細管現象を利用してナイロン膜(バイオダイナB、日本ポール社製)にブロッティングし、スタラタジーン社のUVクロスリンカーを用いて固定し(0.6J/cm²)ハイブリダイゼーションに用いるナイロン膜を得た。プローブとしては、T09073の 5' 側 196塩基対よりなるDNA断片を合成し、これをアマーシャム社製メガプライムDNAラベリングシステムを用いて³²Pで標識したものをを用いた。ハイブリダイゼーション反応は、RNAをブロッティングしたナイロン膜とプローブDNAを上記(2)と同様のハイブリダイゼーション溶液中で42℃48時間放置し行った。反応後、ナイロン膜を42℃の2×SSPE、0.5%(w/v)SDS中で10分間 2-3回洗浄した後、更に、55℃の2×SSPE、0.5%SDS(w/v)中で10分間 2-3回洗浄した後、膜上の放射活性をBAS2000バイオイメージアナライザーで解析した。その結果、図1及び図2に示したように、この遺伝子は成体の中枢神経組織では広く発現しているが、それ以外では胎児期、生後を通じて成体の肺および脾臓のみで発現していることが確認され、中枢神経再生阻止因子の遺伝子として期待される発現分布を示すことが明らかになった。

【0062】

実施例3

ラットセマフォリンW遺伝子のクローニング

上記T09073の配列を有する遺伝子が、実際に新規セマフォリン遺伝子に相当するものであるか否かを確認するために、前記実施例2で調製した196bpのDNA断片をプローブに用いてこの遺伝子の全長をクローニングし、配列を決定することにした。試料調整の容易さから、まずラットの遺伝子をクローニングすることとした。ラット脳及び筋肉から通常の方法で調製したmRNAとラムダザップター(λZapII)cDNAライブラリー作製キット(ストラタジーン社製)とを用いて、前記実験書に紹介されている通常の方法にてcDNAライブラリーを作製した。続いて、このcDNAライブラリーを用いて寒天プレート上に約15万ブランクを作製し、このブランクをナイロン膜(日本ポール社製)に写し、DNAの変性、中和を行った後、 $0.6\text{J}/\text{cm}^2$ の紫外線で固定し、ハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションは、このナイロン膜とプローブとなる ^{32}P でラベルした196bpのDNA断片(アマーシャム社製メガプライムDNAラベリングシステムを用いてアマーシャム社のプロトコルに従って作製した)とをハイブリダイゼーション溶液(45%(v/v)ホルムアミド、5×SSPE、2×デンハルト溶液(和光純薬製)、0.5%(w/v)SDS、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子DNA(和光純薬製))に入れ、 42°C 48時間静置することにより行った。反応後、ナイロン膜を室温で2-3回2×SSPE、0.5%(w/v)SDS中で10分間洗浄した後、更に、 42°C で2-3回2×SSPE、0.5%(w/v)SDS中で10分間洗浄した。こうして得られたフィルターをBAS2000バイオイメージアナライザー(富士フィルム製)で解析し、6個の陽性シグナルを得た。陽性シグナルの位置にあるブランクを寒天プレートから切り出し、 $20\mu\text{l}$ クロロフォルムを添加した $500\mu\text{l}$ エスエム(SM)バッファー(100mM塩化ナトリウム、15mM硫酸マグネシウム、50mMトリス(pH 7.5)、0.01%ゼラチン)に入れた後、 4°C 一晩放置し、ファージを溶出した。こうして得られた組換えラムダファージを先と同様の手順で2次スクリーニングし、単一ブランクを分離した。得られたファージを以下に示すようにストラタジーン社のプロトコルに従って処理し、cDNAインサートを持つファージミドのインビボ切り出しを行った。すなわち、二次スクリーニングから得られた4個のシングルブランクを含む寒天ゲルをそれぞれ $500\mu\text{l}$ のSMバッファーに入れ $20\mu\text{l}$ のクロロホルムを加えた後 4°C 一晩静置した。このファージ溶液 $250\mu\text{l}$ と、 $\text{OD}_{600} = 1.0$ になるように10

mM塩化マグネシウム中に懸濁した大腸菌XL-1BlueMRF' 200 μ l、更に、1 μ l のエックスアシスト (ExAssist) ヘルパーファージ ($>1 \times 10^6$ pfu/ml) とを混ぜ、37°C 15分間培養した。続いて、3ml のエルビー培地 (0.5%(w/v) 塩化ナトリウム、1%(w/v) バクトトリプトン (ディフコ社製)、0.5%(w/v) イーストエキストラクト (ディフコ社製) を混合後5M水酸化ナトリウムで pH7.0に調製) を加えて37°Cで 2-3時間振とう培養した。2000 \times g 15分間遠心して菌体を除去し上清を70°C 15分加熱処理した。その後、再び2000 \times g 15分間遠心し、上清をcDNAインサートを持ったファージミドの保存液として回収した。このファージミドの保存液 10-100 μ l を200 μ l の大腸菌 SOLR(OD₆₀₀ =1.0) に混合し、15分間37°Cで培養した後、アンピシリンプレートに 10-50 μ l まき37°C一晩培養し、目的の遺伝子断片の挿入された2本鎖ファージミドを持つ大腸菌株を取得した。

【0063】

次に、得られたcDNAクローンの塩基配列をパーキンエルマー社の 377型DNAシーケンサーを用いて解析し、全塩基配列を決定した。なお、反応にはプリズムダイターミネーションキット (パーキンエルマー社製) を用いた。決定したDNA塩基配列 (4008塩基) を配列番号：1に、また推定されるオープンリーディングフレーム (2331塩基) を配列番号：2に、またアミノ酸配列 (776アミノ酸) を配列番号：3に示す。

この遺伝子は、そのアミノ酸配列の第62位から第567位に、いわゆるセマフォリンドメインを有していたことから、確かにセマフォリンファミリーに属するタンパクであることが確認されたため、この遺伝子をセマフォリンWと名付けた。なお、実施例2及び実施例3でプローブとして使用したT09073の5'側196塩基対部分は、配列番号1に示すセマフォリンW遺伝子の1561番目から1756番目の塩基配列 (配列番号：7に記載の配列) に対応するものであった。また、配列番号1に示すセマフォリンW遺伝子の1561番目から1924番目の塩基配列は、364bpからなるT09073の配列全長に対して87%の一致を示したところから、T09073がヒト型セマフォリンW遺伝子の部分配列であることが明らかになった。

【0064】

実施例4

ヒトセマフォリンWの配列決定

決定したラット型セマフォリンWの配列とESTデータベースの配列を比較すると、R54387の配列がヒト型セマフォリンWの一部であると考えられたため、このR54387の配列を含んでいるESTクローン（#39491）を米国ゲノムシステムズ社より購入し、実施例3に記載の方法で全塩基配列を決定した。その配列を配列番号4に示す。この配列番号4の塩基配列は配列番号1のラットのセマフォリンWの塩基配列と高い相同性を示し、全体では約76%の塩基が一致していた。またこの5'側には配列番号5に示したようなオープンリーディングフレームの一部と思われる連続して415個のアミノ酸に翻訳できる領域が存在していた。この翻訳できる領域のアミノ酸配列を配列番号6に示す。このアミノ酸配列は配列番号3のラットセマフォリンW遺伝子の361番目から776番目までの配列と93%の一致を示し、この配列がヒト型セマフォリンWの一部分であることが確かめられた。

【0065】

実施例5

セマフォリンW部分タンパク質の大腸菌における発現と精製

セマフォリンWの細胞内ドメイン部分（配列番号3のアミノ酸配列の第687位～第776位に相当する部分）を大腸菌を用いて発現させ、精製を行った。

まず2本のプライマー（5'-GATAAGGATCCGGGTCGCCGTCAGCAGCGT-3'（配列番号：8）、5'-GGCTGGAATTCATTTCCCCGGCTTTA-3'（配列番号：9））を用い、セマフォリンW cDNA（配列番号1）を鋳型にして通常の条件でPCRを行い、細胞内ドメインの配列をコードする310bpの断片を得た。続いてこの断片を制限酵素BamHIとEcoRIとで切断し、同じくBamHIとEcoRI部位で開裂した発現プラスミドpRSETB（インビトロジェン社製）に組み込み、発現プラスミドpRSWincを得た。

このようにして得られたプラスミド、pRSWincを用いて大腸菌BL21(DE3)pLysS（ストラタジーン社製）を形質転換し、アンピシリン50 µg/mlを含むLBプレート上で一夜培養し、形質転換体を得た。形質転換体から調製したプラスミドの塩基配列を解析し、目的の構造を有していることを確認した。このようにして得られた形質転換大腸菌をアンピシリン50 µg/mlを含むLB培地中、37℃で振とう培養し

、OD₆₀₀ = 0.5になった時点でIPTGを終濃度1mMになるように添加し、更に一夜培養した。続いて培養液を5000×g、15min遠心し、菌体を回収した。回収した菌体の総蛋白をSDS-PAGEで解析し、目的の分子量の蛋白が産生されていることを確認した。

次に、この大腸菌で発現させたSemaW部分タンパク質を、アミノ末端側にあるHisタグとニッケルセファロースとの親和性を利用してアフィニティー精製した。方法はキアゲン社のプロトコールに詳しく書かれているが、簡単には、上述のように大腸菌でSemaWタンパク質を発現させ、その菌体1gに対して5mlの割合でA液（6Mグアニジン塩酸、0.1Mリン酸ナトリウム、0.01Mトリス塩酸pH=8.0）を加えてよく懸濁した後、室温で一時間以上攪拌して可溶化した。つづいてこの蛋白溶液をA液であらかじめ平衡をとったNi-NTAレジン（キアゲン社製）と混合し、2時間上室温で穏やかに攪拌して蛋白をレジンを結合させ、その後このレジンをカラムに充填した。そのカラムを10倍量のA液で洗い、続いて5倍量のB液（8M尿素、0.1Mリン酸ナトリウム、0.01Mトリス塩酸pH=8.0）で、次に5倍量のC液（8M尿素、0.1Mリン酸ナトリウム、0.01Mトリス塩酸pH=6.3）で結合している蛋白を溶出した。溶出の際には溶出液を1カラム体積ごとに分取し、SDS-PAGEでタンパクの溶出を確認した後、目的の画分を濃縮し、使用時まで-20℃で保存した。

こうして得られたタンパクのN末端のアミノ酸配列を分析し、目的の蛋白であることを確認した。なお、このセマフォリンW部分タンパクは、例えば抗体作製の抗原として利用することができる。

【0066】

参考例1

セマフォリンIIIを用いたセマフォリン活性必須部位の同定

Neuron, 14, 941-948 (1995)に記載のセマフォリンIIIの配列情報をもとにPCR反応を行い、発現プラスミドpUCSR αにセマフォリンIIIの構造遺伝子を組み込んだ。この発現プラスミドをDEAEデキストラン法でCOS7細胞に導入し、2日後に培養上清に含まれるセマフォリンIIIの活性を、Cell, 75, 217-227 (1993)に記載の方法と同様の方法にてニワトリ後根神経節神経の成長円錐退縮活性を指標

に調べたところ、全く活性を示さないクローンが1つ発見された。そこで、このクローンの塩基配列を決定したところ、198番目のアスパラギン酸がグリシンに変化していた。この198番目を含む前後の領域を他の既知の動物のセマフォリンと比較すると、この領域はセマフォリンドメイン内では際だって保存されている領域ではなかったが、このアスパラギン酸に相当する部位だけは一部のセマフォリンでグルタミン酸になっている以外では非常に良く保存されていた。このことから、このアスパラギン酸が活性発現に必須であることが示唆された。次にこの遺伝子に通常の方法で部位特異的突然変異を導入し、このグリシンをアスパラギン酸に修復したところ強い退縮活性が回復したため、この発現プラスミドのこれ以外の領域は正常に機能することを確認した。以上より、セマフォリンIIIの198番目のアスパラギン酸がセマフォリンの機能発現に必須であると考えられる。なおこのアスパラギン酸に相当するのが配列番号3のセマフォリンWのアミノ酸配列では204番目のグルタミン酸である。

【0067】

参考例2

ノーザン解析によるセマフォリンIIIの組織特異的遺伝子発現

マウスの組織におけるセマフォリンIII遺伝子の発現分布を調べるために成体マウスの種々の組織からRNAを調製し、ノーザン解析を行った。RNAの調製、ブロッティング、ハイブリダイゼーションは、実施例2と同様の方法によって行った。プローブには参考例1に記載したマウスセマフォリンIII DNAの560bpのMspI断片を用いた。その結果、図3に示したように、成体におけるセマフォリンIIIの発現は、末梢器官である肺において非常に強い一方、中枢神経系ではむしろ弱いことが分かった。

【0068】

【発明の効果】

本発明によって成体の中枢神経系全般に強く発現する新規遺伝子セマフォリンWの遺伝子、またはこの遺伝子とハイブリダイズする他のセマフォリン遺伝子、それらの遺伝子と相補的な配列を有するDNA又はRNA、セマフォリンW遺伝子を発現することによって得られるタンパク質、または部分ペプチドあるいは改

変した遺伝子を発現することによって得られる誘導タンパク質、あるいはこれらに対する抗体、さらにセマフォリンWを用いたセマフォリンW阻害物質のスクリーニング系、この系から分離されるセマフォリンW阻害物質などを提供することができる。これらを用いることによって、主として中枢神経の再生促進効果を有する医薬品、あるいはセマフォリンWに関する医学・生物学の研究に有用な試薬が提供される。

【0069】

【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 4008

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列 : No

アンチセンス : No

起源

生物名 : ラット (*Rattus norvegicus*)

組織の種類 : 脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号 : 5' UTR

存在位置 : 1..75

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 76..2406

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : 3' UTR

存在位置 : 2407..3977

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : polyA signal

存在位置 : 3978..4008

特徴を決定した方法 : E

配列

GCCGAGGCCC GCGCAGTAGC GGTACTAAGT AGAGGCTGCT GGACGCGCCC CACCCGGCAC	60
CAGGCGGAGC CAGAGATGCT TGCCAGGGCC GAGCGGCCCC GCGCGGGCCC CCGGCCGCCT	120
CCGGTCTTTC CCTTCCCGCC GCCGCTGTGC CTGCTGCTGC TGCTGGCGAT ACTAAGCGCC	180
CCGGTGTGCG GCCGCGTCCC CCGCTCAGTG CCCAGAACCT CGCTGCCCAT CTCCGAGGCT	240
GACTCCTATC TCACCCGGTT TGCAGCGTCT CATACTGACA ATTACTCTGC TCTCCTTGTC	300
GATCCTGCCT CCCACACACT TTACGTCGGT GCACGGGATA GCATCTTCGC TTTAACCCTC	360
CCCTTCTCTG GGGAAAGACC CCGAAGGATC GACTGGATGG TACCTGAGAC TCACAGACAG	420
AACTGCAGGA AGAAAGGCAA GAAAGAGGAC GAATGTCACA ATTTTATCCA GATTCTCGCC	480
ATTGTCAATG CCTCTCACCT CCTCACGTGC GGCACCTTCG CTTTGTATCC GAAGTGCGGG	540
GTTATTGATG TGTCCAGTTT CCAGCAGGTT GAAAGACTTG AGAGCGGCCG GGGGAAATGT	600
CCTTTTGAGC CAGCTCAACG GTCAGCAGCT GTAATGGCTG GGGGCGTCCT CTACACCGCC	660
ACTGTGAAGA ACTTCCTGGG GACTGAGCCC ATCATCTCCC GAGCTGTGGG TCGAGCTGAG	720
GACTGGATTG GAACAGAGAC CTTGTCATCC TGGCTTAATG CTCCAGCCTT TGTCGCAGCT	780
ATGGTCCTGA GCCCAGCTGA GTGGGGGGAT GAAGATGGAG ACGATGAAAT CTTTTTTTTC	840
TTCACGGAGA CCTCCCGAGT GTTGGACTCC TATGAGCGCA TCAAGGTCCC AAGAGTGGCC	900
CGAGTGTGTG CGGGGGACCT TGGGGGCAGG AAGACCCTTC AGCAGAGATG GACGACGTTT	960
CTGAAGGCTG ACCTGCTGTG CCCAGGGCCC GAGCATGGCC GGGCCTCCGG GGTTCGTGAG	1020
GCTATGGCAG AGCTTCGGCC TCAGCCTGGA GCGGGAACCC CCATCTTTTA TGGGATCTTT	1080
TCCTCCAGT GGGAAAGAGC TGCCATCTCT GCTGTGTGTG CCTCCGACC CCAAGACATC	1140
CGGGCAGTGC TGAATGGTCC CTTTAGAGAG CTA AACATG ACTGCAACAG GGGACTGCCT	1200
GTCATGGACA ACGAGGTGCC CCAGCCCAGA CCTGGAGAGT GCATCGCCAA CAACATGAAG	1260
CTCCAGCAGT TTGGATCCTC ACTCTCCCTG CCAGACCGCG TGCTCACCTT TATCAGAGAC	1320
CACCTCTCA TGGACAGGCC CGTGTTCCCG GCTGACGGCC GCCCCCTGCT GGTCACTACA	1380
GATACAGCCT ATCTCAGAGT CGTGCCCCAC AGGGTGACCA GCCTCTCAGG GAAAGAATAT	1440
GACGTGCTCT ACCTGGGGAC AGAGGATGGA CACCTCCACC GGGCTGTGCG CATTGGAGCT	1500
CAGCTCAGTG TCTTGGAGGA TCTGGCCTTG TTCCAGAAC CACAGCCGGT TGAGAGCATG	1560
AAATTGTACC ACGATTGGCT CCTGGTGGGC TCCCATCTG AGGTGACACA AGTGAACACC	1620
AGCAACTGTG GCCGTCTCCA GAGCTGCTCG GAGTGTATCC TGGCCCAGGA CCCCCTGTGC	1680

GCCTGGAGCT	TCCGGCTTGA	TGCTTGTGTG	GCCCACGCCG	GCGAGCACCG	CGGGATGGTT	1740
CAAGATATAG	AGTCAGCGGA	TGTCTCTTCT	TTGTGTCCAA	AAGAACCTGG	AGAACATCCC	1800
GTAGTGTTTG	AAGTTCCGGT	GGCTACTGTG	GGCCACGTGG	TCCTGCCATG	TTCCCCAGT	1860
TCTGCCTGGG	CATCCTGTGT	GTGGCACCAG	CCCAGTGGAG	TGACTGCGCT	CACTCCCCGG	1920
AGGGATGGAC	TAGAGGTGGT	GGTGACCCCA	GGGGCCATGG	GGGCTTATGC	TTGCGAGTGT	1980
CAGGAGGGTG	GAGCCGCCCC	CGTGGTGGCT	GCTTATAGCT	TGGTGTGGGG	CAGCCAGCGG	2040
GGACCCTCAA	ACCGGGCCCA	CACCGTTGTG	GGGGCTGGAT	TGGTTGGCTT	TCTCCTGGGT	2100
GTTCTTGCAG	CATCCCTCAC	TCTCCTCCTG	ATTGGTCGCC	GTCAGCAGCG	TCGGCGACAG	2160
AGGGAGCTTC	TAGCTAGAGA	CAAGGTGGGC	TTAGATCTGG	GGGCTCCACC	TTCTGGGACC	2220
ACAAGCTATA	GTCAGGACCC	TCCCTCTCCT	TCGCCTGAAG	ATGAACGGCT	GCCCCTGGCC	2280
CTGGGTAAGC	GGGGCAGTGG	TTTGGTGGC	TTCCCTCCAC	CCTTCCTGCT	GGATTCTTGC	2340
CCAAGCCCAG	CCCACATCCG	GCTCACTGGG	GCGCCTCTAG	CCACGTGTGA	TGAGACCTCC	2400
ATCTAAAGCC	GGGGAAAATG	ACTGCCAGCC	ATGAGCAGTC	TCTGGAATA	GTGGCTACCA	2460
AGACCATGAT	CATGGCTGCT	CCTTTCTCTT	GGAGTCTGTG	TGTTACACAC	TTAGTGTCTG	2520
TCCTCTGGAC	CTGGACCTGG	CCTTTGCCCC	GATTCTGAT	TCTCATGAGA	GATCAACCCT	2580
GTAACCTTCT	GCGATGGCCT	CTTGTCTTGG	GCCCATCAGC	TTGTGGGGTG	GAGTAAGGAC	2640
ATAGGCCCCG	GAAAGGGAAT	CAGTGTGGAG	GTAGTTGGGG	CGTGTGTGCC	CTGCGTCCTT	2700
GTGGTGGCTG	TATGATTTC	CAGTCTGCTG	ACTCTGGGGA	GCGCATGATC	CCCTGACTGC	2760
CTTGAGATCT	CTCCCAACTC	AGTTTCCCCT	TGCTCTGGAA	GAGTGTGTGT	CTATACACTG	2820
GTGTGCCTAG	AAGGCCTGTC	CATGTGTGCA	TGGACGACAG	GGCCGGTGCC	TCGGTGCTTT	2880
TGGGGAGTCG	GAGAGAAAGG	TTGGAATGGG	GGACAACCTA	ACCCTCGGTA	GCCAGTGAGG	2940
GAAACCACAT	GCCCGTCCCC	ATCACCCAC	AGCGCTTCTT	TAACTTTGAG	CAAAGTTCCC	3000
AAAGTGACCT	TCTGGGTGGG	AAGGGCAGCA	GGACATGTGG	CCCCCGTCCT	TCTCCTTGTC	3060
TTTCCCTTCT	GGCTGCCAAC	CACTGCCGTG	CCACCGCTGC	GCTTTCCCTG	GCTGGAGTGG	3120
AGGCTGAGTC	CTCTGTCCTT	GGTTTCCATT	TAAAATGAAC	TTCACAACAT	TCTAAATATT	3180
GGGGGATGAC	AAATGACTTT	TTTCCCCAGA	AAAGTGTGTA	GGAAATACAA	GCAGGTAAAA	3240
GAAGATTTGC	CTCAGTGA	TTCACCCTTG	CCCTAAAGCA	GGAGTCCCTC	AGCTAGCGTC	3300
TGTGGACTCC	CTGAAATTGT	ATGCGTCTGT	GGA	CTCCCTG	AAATTGTATG	3360
GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTTTGC	GTGTGTGCAT	3420

```

GTGTGTTTGA TGGCTTTCAT CAGATTCTCA AGGCCTTAAT GAGGTAAAG GACCACGGCC 3480
TATAGTCACC AACTTGGGC CACATGGAGG AGGTGTTGCT CTCTGAGGCA GTTCCTCCCT 3540
GGCCTGCCTG AGGCCAGCCC CTGGACACAT TGCTGCTGGA GACCCACAT CTCTCCAGAA 3600
CTTGGAAGCT AGGCTCTGCG CGTGCTTGAA GGCACCACCA TCTCCCTTCT TGCTTCATTC 3660
TCCTGTGTGC TCTGCCTCTG CTCAGTCCTG CTCTTGGCCT GTGAATGTGC CTCGCCCGTC 3720
CCTGGTGGGG GACCTCAAAC CCCAGTGCTG ATGCTACCCT TTCCAGTGGG AGTTTCTGTT 3780
CTGCTTTCCT TGACAGCAGC CTGTGAACTA CTCACGAGTC CCCTTGGTTT GGAGTTCCCG 3840
TGCGCTTTGA GTAGGATCTT TGGCGTGGCA TCTAACCTAG CAGCATTGAT CGTTCATTGT 3900
AAAGTGGGGA TATACCTACC TCAGGGTTGC TGCAAGGATC AAACGAGGAA ACGTATAAAT 3960
AAAGCATTAC CCACAGCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 4008

```

【0070】

配列番号：2

配列の長さ：2331

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

起源

生物名：ラット (*Rattus norvegicus*)

組織の種類：脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..2331

特徴を決定した方法：E

配列

```

ATGCTTGCCA GGGCCGAGCG GCGCCGCGCG GCGCCCGCGC CGCCTCCGGT CTTTCCCTTC 60
CGCGCGCGCG TGTCGCTGCT GCTGCTGCTG GCGATACTAA GCGCCCGCGT GTGCGGCCGC 120

```

GTCCCCCGCT	CAGTGCCCAG	AACCTCGCTG	CCCATCTCCG	AGGCTGACTC	CTATCTCACC	180
CGGTTTGAG	CGTCTCATA	GTACAATTAC	TCTGCTCTCC	TTGTGGATCC	TGCCTCCCAC	240
ACACTTTACG	TCGGTGCACG	GGATAGCATC	TTCGCTTTAA	CCCTCCCCTT	CTCTGGGGAA	300
AGACCCCGAA	GGATCGACTG	GATGGTACCT	GAGACTCACA	GACAGAACTG	CAGGAAGAAA	360
GGCAAGAAAG	AGGACGAATG	TCACAATTTT	ATCCAGATTG	TCGCCATTGT	CAATGCCTCT	420
CACCTCCTCA	CGTGCGGCAC	CTTCGCTTTT	GATCCGAAGT	GCGGGGTTAT	TGATGTGTCC	480
AGTTTCCAGC	AGGTTGAAAG	ACTTGAGAGC	GGCCGGGGGA	AATGTCCTTT	TGAGCCAGCT	540
CAACGGTCAG	CAGCTGTAAT	GGCTGGGGGC	GTCCTCTACA	CCGCCACTGT	GAAGAACTTC	600
CTGGGGACTG	AGCCCATCAT	CTCCCGAGCT	GTGGGTCGAG	CTGAGGACTG	GATTGGAACA	660
GAGACCTTGT	CATCCTGGCT	TAATGCTCCA	GCCTTTGTG	CAGCTATGGT	CCTGAGCCCA	720
GCTGAGTGGG	GGGATGAAGA	TGGAGACGAT	GAAATCTTTT	TTTTCTTCAC	GGAGACCTCC	780
CGAGTGTGG	ACTCCTATGA	GCGCATCAAG	GTCCCAAGAG	TGGCCCGAGT	GTGTGCGGGG	840
GACCTTGGGG	GCAGGAAGAC	CCTTCAGCAG	AGATGGACGA	CGTTTCTGAA	GGCTGACCTG	900
CTGTGCCCAG	GGCCCGAGCA	TGGCCGGGCC	TCCGGGGTTC	TGCAGGCTAT	GGCAGAGCTT	960
CGGCCTCAGC	CTGGAGCGGG	AACCCCCATC	TTTTATGGGA	TCTTTTCCTC	CCAGTGGGAA	1020
GGAGCTGCCA	TCTCTGCTGT	GTGTGCCTTC	CGACCCCAAG	ACATCCGGGC	AGTGCTGAAT	1080
GGTCCCTTTA	GAGAGCTAAA	ACATGACTGC	AACAGGGGAC	TGCCTGTCAT	GGACAACGAG	1140
GTGCCCCAGC	CCAGACCTGG	AGAGTGCATC	GCCAACAACA	TGAAGCTCCA	GCAGTTTGGA	1200
TCCTCACTCT	CCCTGCCAGA	CCGCGTGCTC	ACCTTTATCA	GAGACCACCC	TCTCATGGAC	1260
AGGCCCGTGT	TCCCGGCTGA	CGGCCGCCCC	CTGCTGGTCA	CTACAGATAC	AGCCTATCTC	1320
AGAGTCGTGG	CCCACAGGGT	GACCAGCCTC	TCAGGGAAAG	AATATGACGT	GCTCTACCTG	1380
GGGACAGAGG	ATGGACACCT	CCACCGGGCT	GTGCGCATTG	GAGCTCAGCT	CAGTGTCTTG	1440
GAGGATCTGG	CCTTGTTCCC	AGAACCACAG	CCGGTTGAGA	GCATGAAATT	GTACCACGAT	1500
TGGCTCCTGG	TGGGCTCCCA	TACTGAGGTG	ACACAAGTGA	ACACCAGCAA	CTGTGGCCGT	1560
CTCCAGAGCT	GCTCGGAGTG	TATCCTGGCC	CAGGACCCCG	TGTGCGCCTG	GAGCTTCCGG	1620
CTTGATGCTT	GTGTGGCCCA	CGCCGGCGAG	CACCGCGGGA	TGGTTCAAGA	TATAGAGTCA	1680
GCGGATGTCT	CTTCTTTGTG	TCCAAAAGAA	CCTGGAGAAC	ATCCCGTAGT	GTTTGAAGTT	1740
CCGGTGGCTA	CTGTGGGCCA	CGTGGTCCTG	CCATGTTCCC	CCAGTTCTGC	CTGGGCATCC	1800
TGTGTGTGGC	ACCAGCCCAG	TGGAGTGA	GCGCTCACTC	CCCGGAGGGA	TGGACTAGAG	1860

GTGGTGGTGA CCCCAGGGGC CATGGGGGCT TATGCTTGCG AGTGTGAGGA GGGTGGAGCC 1920
 GCGCGGTGG TGGCTGCTTA TAGCTTGGTG TGGGGCAGCC AGCGGGGACC CTCAAACCGG 1980
 GCCCACACCG TTGTGGGGGC TGGATTGGTT GGCTTTCTCC TGGGTGTTCT TGCAGCATCC 2040
 CTCCTCTCC TCCTGATTGG TCGCCGTCAG CAGCGTCGGC GACAGAGGGA GCTTCTAGCT 2100
 AGAGACAAGG TGGGCTTAGA TCTGGGGGCT CCACCTTCTG GGACCACAAG CTATAGTCAG 2160
 GACCCTCCCT CTCCTTCGCC TGAAGATGAA CGGCTGCCCC TGGCCCTGGG TAAGCGGGGC 2220
 AGTGGTTTTG GTGGCTTCCC TCCACCCTTC CTGCTGGATT CTTGCCCAAG CCCAGCCCAC 2280
 ATCCGGCTCA CTGGGGCGCC TCTAGCCACG TGTGATGAGA CCTCCATCTA A 2331

【0071】

配列番号：3

配列の長さ：776

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ラット (*Rattus norvegicus*)

組織の種類：脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1..776

特徴を決定した方法：P

配列

Met Leu Ala Arg Ala Glu Arg Pro Arg Pro Gly Pro Arg Pro Pro Pro

1 5 10 15

Val Phe Pro Phe Pro Pro Pro Leu Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ile

20 25 30

Leu Ser Ala Pro Val Cys Gly Arg Val Pro Arg Ser Val Pro Arg Thr

35 40 45

Ser Leu Pro Ile Ser Glu Ala Asp Ser Tyr Leu Thr Arg Phe Ala Ala

50	55	60
Ser His Thr Tyr Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Val Asp Pro Ala Ser His		
65	70	75
Thr Leu Tyr Val Gly Ala Arg Asp Ser Ile Phe Ala Leu Thr Leu Pro		
85	90	95
Phe Ser Gly Glu Arg Pro Arg Arg Ile Asp Trp Met Val Pro Glu Thr		
100	105	110
His Arg Gln Asn Cys Arg Lys Lys Gly Lys Lys Glu Asp Glu Cys His		
115	120	125
Asn Phe Ile Gln Ile Leu Ala Ile Val Asn Ala Ser His Leu Leu Thr		
130	135	140
Cys Gly Thr Phe Ala Phe Asp Pro Lys Cys Gly Val Ile Asp Val Ser		
145	150	155
Ser Phe Gln Gln Val Glu Arg Leu Glu Ser Gly Arg Gly Lys Cys Pro		
165	170	175
Phe Glu Pro Ala Gln Arg Ser Ala Ala Val Met Ala Gly Gly Val Leu		
180	185	190
Tyr Thr Ala Thr Val Lys Asn Phe Leu Gly Thr Glu Pro Ile Ile Ser		
195	200	205
Arg Ala Val Gly Arg Ala Glu Asp Trp Ile Arg Thr Glu Thr Leu Ser		
210	215	220
Ser Trp Leu Asn Ala Pro Ala Phe Val Ala Ala Met Val Leu Ser Pro		
225	230	235
Ala Glu Trp Gly Asp Glu Asp Gly Asp Asp Glu Ile Phe Phe Phe Phe		
245	250	255
Thr Glu Thr Ser Arg Val Leu Asp Ser Tyr Glu Arg Ile Lys Val Pro		
260	265	270
Arg Val Ala Arg Val Cys Ala Gly Asp Leu Gly Gly Arg Lys Thr Leu		
275	280	285

Gln Gln Arg Trp Thr Thr Phe Leu Lys Ala Asp Leu Leu Cys Pro Gly
 290 295 300

Pro Glu His Gly Arg Ala Ser Gly Val Leu Gln Ala Met Ala Glu Leu
 305 310 315 320

Arg Pro Gln Pro Gly Ala Gly Thr Pro Ile Phe Tyr Gly Ile Phe Ser
 325 330 335

Ser Gln Trp Glu Gly Ala Ala Ile Ser Ala Val Cys Ala Phe Arg Pro
 340 345 350

Gln Asp Ile Arg Ala Val Leu Asn Gly Pro Phe Arg Glu Leu Lys His
 355 360 365

Asp Cys Asn Arg Gly Leu Pro Val Met Asp Asn Glu Val Pro Gln Pro
 370 375 380

Arg Pro Gly Glu Cys Ile Ala Asn Asn Met Lys Leu Gln Gln Phe Gly
 385 390 395 400

Ser Ser Leu Ser Leu Pro Asp Arg Val Leu Thr Phe Ile Arg Asp His
 405 410 415

Pro Leu Met Asp Arg Pro Val Phe Pro Ala Asp Gly Arg Pro Leu Leu
 420 425 430

Val Thr Thr Asp Thr Ala Tyr Leu Arg Val Val Ala His Arg Val Thr
 435 440 445

Ser Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Asp Val Leu Tyr Leu Gly Thr Glu Asp
 450 455 460

Gly His Leu His Arg Ala Val Arg Ile Gly Ala Gln Leu Ser Val Leu
 465 470 475 480

Glu Asp Leu Ala Leu Phe Pro Glu Pro Gln Pro Val Glu Ser Met Lys
 485 490 495

Leu Tyr His Asp Trp Leu Leu Val Gly Ser His Thr Glu Val Thr Gln
 500 505 510

Val Asn Thr Ser Asn Cys Gly Arg Leu Gln Ser Cys Ser Glu Cys Ile

515	520	525
Leu Ala Gln Asp Pro Val Cys Ala Trp Ser Phe Arg Leu Asp Ala Cys		
530	535	540
Val Ala His Ala Gly Glu His Arg Gly Met Val Gln Asp Ile Glu Ser		
545	550	555
Ala Asp Val Ser Ser Leu Cys Pro Lys Glu Pro Gly Glu His Pro Val		
565	570	575
Val Phe Glu Val Pro Val Ala Thr Val Gly His Val Val Leu Pro Cys		
580	585	590
Ser Pro Ser Ser Ala Trp Ala Ser Cys Val Trp His Gln Pro Ser Gly		
595	600	605
Val Thr Ala Leu Thr Pro Arg Arg Asp Gly Leu Glu Val Val Val Thr		
610	615	620
Pro Gly Ala Met Gly Ala Tyr Ala Cys Glu Cys Gln Glu Gly Gly Ala		
625	630	635
Ala Arg Val Val Ala Ala Tyr Ser Leu Val Trp Gly Ser Gln Arg Gly		
645	650	655
Pro Ser Asn Arg Ala His Thr Val Val Gly Ala Gly Leu Val Gly Phe		
660	665	670
Leu Leu Gly Val Leu Ala Ala Ser Leu Thr Leu Leu Leu Ile Gly Arg		
675	680	685
Arg Gln Gln Arg Arg Arg Gln Arg Glu Leu Leu Ala Arg Asp Lys Val		
690	695	700
Gly Leu Asp Leu Gly Ala Pro Pro Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Ser Gln		
705	710	715
Asp Pro Pro Ser Pro Ser Pro Glu Asp Glu Arg Leu Pro Leu Ala Leu		
725	730	735
Gly Lys Arg Gly Ser Gly Phe Gly Gly Phe Pro Pro Pro Phe Leu Leu		
740	745	750

Asp Ser Cys Pro Ser Pro Ala His Ile Arg Leu Thr Gly Ala Pro Leu

755

760

765

Ala Thr Cys Asp Glu Thr Ser Ile

770

775

【0072】

配列番号：4

配列の長さ：1824

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

組織の種類：小児脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..1249

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：3' UTR

存在位置：1250..1804

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：polyA signal

存在位置：1805..1824

特徴を決定した方法：E

配列

TGGTCCCTTC	AGAGAACTAA	AACATGACTG	CAACAGAGGA	CTGCCTGTCTG	TGGACAATGA	60
TGTGCCCCAG	CCCAGACCTG	GAGAGTGCAT	CACCAACAAC	ATGAAGCTCC	GGCACTTTGG	120
CTCATCTCTC	TCCCTGCCTG	ACCGCGTACT	CACCTTCATC	CGGGACCACC	CACTCATGGA	180
CAGGCCAGTG	TTTCCAGCTG	ATGGCCACCC	CCTGCTGGTC	ACTACAGATA	CAGCCTATCT	240
CAGAGTCGTG	GCCCACAGGG	TGACCAGCCT	CTCAGGGAAA	GAGTATGATG	TGCTCTACCT	300
GGGGACAGAG	GATGGACACC	TCCACCGAGC	AGTGCCGATC	GGAGCTCAGC	TCAGCGTTCT	360
TGAAGATCTG	GCCTTATTCC	CAGAGCCACA	GCCAGTTGAG	AACATGAAAT	TGTACCACAG	420
CTGGCTCCTG	GTTGGCTCCC	GTACTGAGGT	GACACAAGTG	AATACAACCA	ACTGTGGCCG	480
TCTCCAGAGC	TGCTCAGAGT	GCATCCTGGC	CCAGGACCCA	GTCTGTGCCT	GGAGCTTCCG	540
GCTGGATGAG	TGTGTGGCCC	ATGCCGGGGA	GCACCGAGGG	TTGGTCCAAG	ACATAGAGTC	600
AGCAGATGTC	TCCTCTTTGT	GTCTTAAAGA	GCCTGGAGAA	CGTCCAGTAG	TGTTTGAAGT	660
TCCCGTGGCT	ACAGCTGCGC	ATGTGGTCTT	GCCATGTTCT	CCAAGCTCAG	CATGGGCATC	720
CTGTGTGTGG	CACCAGCCCA	GTGGAGTGAC	TGCACTCACC	CCCCGGCGGG	ATGGACTGGA	780
GGTGGTGGTG	ACCCCAGGGG	CCATGGGCGC	TTATGCCTGT	GAATGTCAGG	AGGGTGGGGC	840
AGCCCATGTG	GTAGCAGCTT	ACAGCTTGGT	ATGGGGCAGC	CAGCGAGATG	CTCCGAGCCG	900
GGCCACACA	GTGGGGGCGG	GACTGGCTGG	CTTCTTCTTG	GGGATTCTCG	CAGCATCCCT	960
GACTCTCATT	CTGATTGGTC	GGCGTCAGCA	GCGACGGCGA	CAGAGGGAAC	TTCTGGCTAG	1020
AGACAAGGTG	GGCCTGGACC	TGGGGGCTCC	ACCTTCTGGG	ACCACAAGCT	ACAGCCAAGA	1080
CCCTCCCTCC	CCCTCTCCTG	AAGATGAGCG	GTTGCCGCTG	GCCCTGGCCA	AGAGGGGCAG	1140
TGGCTTTGGT	GGATTCTCAC	CACCCTTCCT	GCTTGATCCT	TGCCCCAAGCC	CAGCCCACAT	1200
TCGGCTAACT	GGGGCTCCTC	TAGCCACATG	TGATGAAACA	TCCATCTAGA	GCTGGGCAAA	1260
TGACCACTAG	TGTATAAGTG	ATCACTGGAA	CGGAGTGACC	ACTGAGATGC	TGGGGGTCAC	1320
TGGGCCTGGA	AGACCATCCC	AGCCTCTGAG	TTCTCTTTGA	GTATGAGTGA	TTACTTGGAT	1380
TTTAGTATCT	GTTCTCTCTG	AGCCTGGATG	GGCTTGGGGC	CAGACCTTTG	CCTGATTCCCT	1440
GATTCCCATG	AGAAATCAGA	ACTGCTTTCT	GCAGCAAATC	AGGGCTTCCC	CCTAACATCT	1500
GAACTCCTGT	AAACCTTCAT	CCCTGGCCCC	CTATCTTGGG	CCCATTAGTT	TTGGGGATGG	1560
GGCACAGGGC	ATAGCTATGA	CTTTGCTTTC	TGGTTGGAGC	CTGGCCGGAA	GGAAGAGCCC	1620
TGGAGGTGGT	TGGGGGCAAA	TGTGCCCTGA	GTCCTTGGGG	TGGTTCTGCT	TATTCTTCAA	1680
GTTTATCTGA	ATCTGTGGGG	AGTGCATGAT	CCCCATGTTG	CAATATGGAG	TCTCTGCCCT	1740

GAGATCTTCC CCATCTCAGT TTCCTTCCA TGAAAGAGTA CGTGTAATA CATAGTGTC 1800
ATAAGAAAAA AAAAAAAAAA AAAA 1824

【0073】

配列番号：5

配列の長さ：1245

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

組織の種類：小児脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..1245

特徴を決定した方法：E

配列

GGTCCCTTCA GAGAACTAAA ACATGACTGC AACAGAGGAC TGCCTGTCGT GGACAATGAT 60
GTGCCCCAGC CCAGACCTGG AGAGTGCATC ACCAACAACA TGAAGCTCCG GCACTTTGGC 120
TCATCTCTCT CCCTGCCTGA CCGCGTACTC ACCTTCATCC GGGACCACCC ACTCATGGAC 180
AGGCCAGTGT TTCCAGCTGA TGGCCACCCC CTGCTGGTCA CTACAGATAC AGCCTATCTC 240
AGAGTCGTGG CCCACAGGGT GACCAGCCTC TCAGGGAAG AGTATGATGT GCTCTACCTG 300
GGGACAGAGG ATGGACACCT CCACCGAGCA GTGCGGATCG GAGCTCAGCT CAGCGTTCTT 360
GAAGATCTGG CCTTATTCCC AGAGCCACAG CCAGTTGAGA ACATGAAATT GTACCACAGC 420
TGGCTCCTGG TTGGCTCCCG TACTGAGGTG ACACAAGTGA ATACAACCAA CTGTGGCCGT 480
CTCCAGAGCT GCTCAGAGTG CATCCTGGCC CAGGACCCAG TCTGTGCCTG GAGCTTCCGG 540
CTGGATGAGT GTGTGGCCCA TGCCGGGGAG CACCGAGGGT TGGTCCAAGA CATAGAGTCA 600

GCAGATGTCT CCTCTTTGTG TCCTAAAGAG CCTGGAGAAC GTCCAGTAGT GTTTGAAGTT 660
 CCCGTGGCTA CAGCTGCGCA TGTGGTCTTG CCATGTTCTC CAAGCTCAGC ATGGGCATCC 720
 TGTGTGTGGC ACCAGCCCAG TGGAGTGA CTGCACTACCC CCCGGCGGGA TGGACTGGAG 780
 GTGGTGGTGA CCCCAGGGGC CATGGGCGCT TATGCCTGTG AATGTCAGGA GGGTGGGGCA 840
 GCCCATGTGG TAGCAGCTTA CAGCTTGGTA TGGGGCAGCC AGCGAGATGC TCCGAGCCGG 900
 GCCCACACAG TGGGGGCGGG ACTGGCTGGC TTCTTCTTGG GGATTCTCGC AGCATCCCTG 960
 ACTCTCATTG TGATTGGTCG GCGTCAGCAG CGACGGCGAC AGAGGGAACT TCTGGCTAGA 1020
 GACAAGGTGG GCCTGGACCT GGGGGCTCCA CCTTCTGGGA CCACAAGCTA CAGCCAAGAC 1080
 CCTCCCTCCC CCTCTCCTGA AGATGAGCGG TTGCCGCTGG CCCTGGCCAA GAGGGGCAGT 1140
 GGCTTTGGTG GATTCTCACC ACCCTTCCTG CTTGATCCTT GCCCAAGCCC AGCCCACATT 1200
 CGGCTAACTG GGGCTCCTCT AGCCACATGT GATGAAACAT CCATC 1245

【0074】

配列番号：6

配列の長さ：415

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

組織の種類：小児脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1..415

特徴を決定した方法：P

配列

Gly Pro Phe Arg Glu Leu Lys His Asp Cys Asn Arg Gly Leu Pro Val

1 5 10 15

Val Asp Asn Asp Val Pro Gln Pro Arg Pro Gly Glu Cys Ile Thr Asn

20 25 30

Asn Met Lys Leu Arg His Phe Gly Ser Ser Leu Ser Leu Pro Asp Arg
 35 40 45
 Val Leu Thr Phe Ile Arg Asp His Pro Leu Met Asp Arg Pro Val Phe
 50 55 60
 Pro Ala Asp Gly His Pro Leu Leu Val Thr Thr Asp Thr Ala Tyr Leu
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ala His Arg Val Thr Ser Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Asp
 85 90 95
 Val Leu Tyr Leu Gly Thr Glu Asp Gly His Leu His Arg Ala Val Arg
 100 105 110
 Ile Gly Ala Gln Leu Ser Val Leu Glu Asp Leu Ala Leu Phe Pro Glu
 115 120 125
 Pro Gln Pro Val Glu Asn Met Lys Leu Tyr His Ser Trp Leu Leu Val
 130 135 140
 Gly Ser Arg Thr Glu Val Thr Gln Val Asn Thr Thr Asn Cys Gly Arg
 145 150 155 160
 Leu Gln Ser Cys Ser Glu Cys Ile Leu Ala Gln Asp Pro Val Cys Ala
 165 170 175
 Trp Ser Phe Arg Leu Asp Glu Cys Val Ala His Ala Gly Glu His Arg
 180 185 190
 Gly Leu Val Gln Asp Ile Glu Ser Ala Asp Val Ser Ser Leu Cys Pro
 195 200 205
 Lys Glu Pro Gly Glu Arg Pro Val Val Phe Glu Val Pro Val Ala Thr
 210 215 220
 Ala Ala His Val Val Leu Pro Cys Ser Pro Ser Ser Ala Trp Ala Ser
 225 230 235 240
 Cys Val Trp His Gln Pro Ser Gly Val Thr Ala Leu Thr Pro Arg Arg
 245 250 255
 Asp Gly Leu Glu Val Val Val Thr Pro Gly Ala Met Gly Ala Tyr Ala

260	265	270
Cys Glu Cys Gln Glu Gly Gly Ala Ala His Val Val Ala Ala Tyr Ser		
275	280	285
Leu Val Trp Gly Ser Gln Arg Asp Ala Pro Ser Arg Ala His Thr Val		
290	295	300
Gly Ala Gly Leu Ala Gly Phe Phe Leu Gly Ile Leu Ala Ala Ser Leu		
305	310	315
Thr Leu Ile Leu Ile Gly Arg Arg Gln Gln Arg Arg Arg Gln Arg Glu		
325	330	335
Leu Leu Ala Arg Asp Lys Val Gly Leu Asp Leu Gly Ala Pro Pro Ser		
340	345	350
Gly Thr Thr Ser Tyr Ser Gln Asp Pro Pro Ser Pro Ser Pro Glu Asp		
355	360	365
Glu Arg Leu Pro Leu Ala Leu Ala Lys Arg Gly Ser Gly Phe Gly Gly		
370	375	380
Phe Ser Pro Pro Phe Leu Leu Asp Pro Cys Pro Ser Pro Ala His Ile		
385	390	395
Arg Leu Thr Gly Ala Pro Leu Ala Thr Cys Asp Glu Thr Ser Ile		
405	410	415

【0075】

配列番号：7

配列の長さ：196

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

起源

生物名：ヒト (Homo sapiens)

組織の種類：脳組織

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..196

特徴を決定した方法：E

配列

AAATTGTACC ACAGCTGGCT CCTGGTTGGC TCCCGTACTG AGGTGACACA AGTGAATACA	60
ACCAACTGTG GCCGTCTCCA GAGCTGCTCA GAGTGCATCC TGGCCCAGGA CCCAGTCTGT	120
GCCTGGAGCT TCCGGCTGGA TGAGTGTGTG GCCCATGCCG GGGAGCACCG AGGGTTGGTC	180
CAAGACATAG AGTCAG	196

【0076】

配列番号：8

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GATAAGGATC CGGGTCGCCG TCAGCAGCGT	30
----------------------------------	----

【0077】

配列番号：9

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

特平 8-287636

ハイボセティカル配列 : No

アンチセンス : yes

配列

GGCTGGAATT CATTTTCCCC GGCTTTA

27

【図面の簡単な説明】

【図1】

ノーザン解析による種々の組織におけるセマフォリンWの発現分布を示す電気泳動の写真。

6週令のラットの組織から全RNAを抽出し、1%寒天-ホルムアミドゲル中で電気泳動し、フィルターにブロッティング後³²Pで標識したラットセマフォリンWDNAプローブでハイブリダイズし、セマフォリンWmRNA発現分布を調べた。各レーン15μgのRNAを泳動した。上図、オートラジオグラムの結果。

18S、28SリボソームRNAの位置を図の左端に示した。下図、ゲルの臭化エチジウム染色像。上、下、2本のバンドは、それぞれ、28S、18SリボソームRNA。

【図2】

ノーザン解析による胎生期及び成体の中枢神経系でのセマフォリンWの発現分布を示す電気泳動の写真。

種々の令数のラット組織から全RNAを抽出し、1%寒天-ホルムアミドゲル中で電気泳動し、フィルターにブロッティング後³²Pで標識したラットセマフォリンWDNAプローブでハイブリダイズし、セマフォリンWmRNA発現分布を調べた。E12、E15、E18、P0は、各々胎生12、15、18日及び出生直後を示す。中枢神経組織内分布(左側の9レーン)は、全て6週令。各レーン15μgのRNAを泳動した。上図、オートラジオグラムの結果。18S、28SリボソームRNAの位置を図の左端に示した。下図、ゲルの臭化エチジウム染色像。上、下の2本のバンドは、それぞれ、28S、18SのリボソームRNA。

【図3】

ノーザン解析による生体組織でのセマフォリンIIIの発現分布を示す電気泳動の写真。

成体マウスの種々の組織から全RNAを抽出し、1%寒天-ホルムアミドゲル中で電気泳動し、フィルターにブロッティング後、³²Pで標識したマウスセマフォリンIII DNAプローブでハイブリし、セマフォリンIII mRNA発現分布を調べた。各レーン15μgのRNAを泳動した。上図、オートラジオグラムの結果

。18S,28S リボソームRNAの位置を図の左端に示した。下図、ゲルの臭化エチジウム染色像。上、下の2本のバンドは、それぞれ、28S、18SのリボソームRNA。

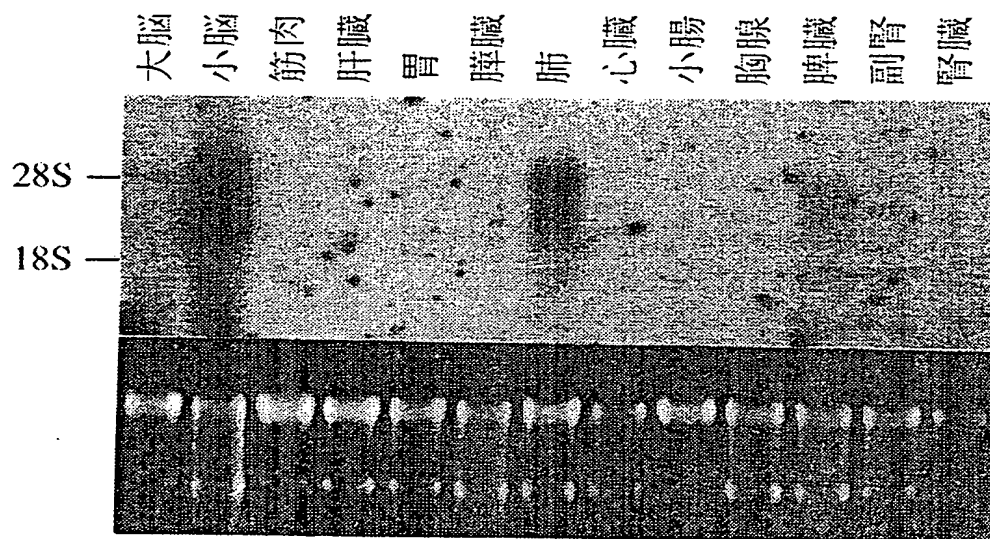
特平 8-287636

【書類名】

図面

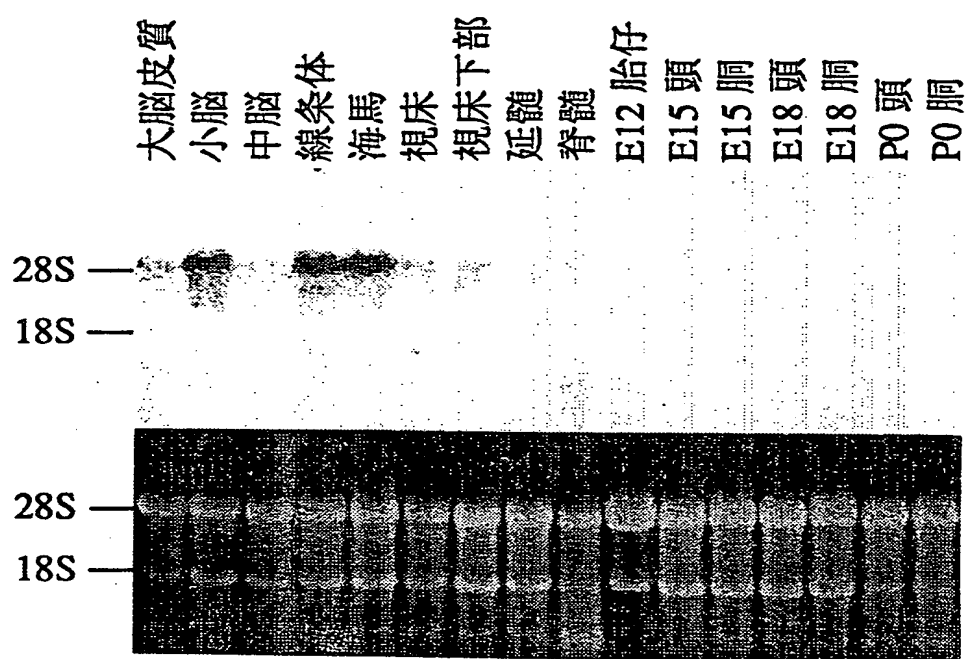
【図1】

図面代用写真



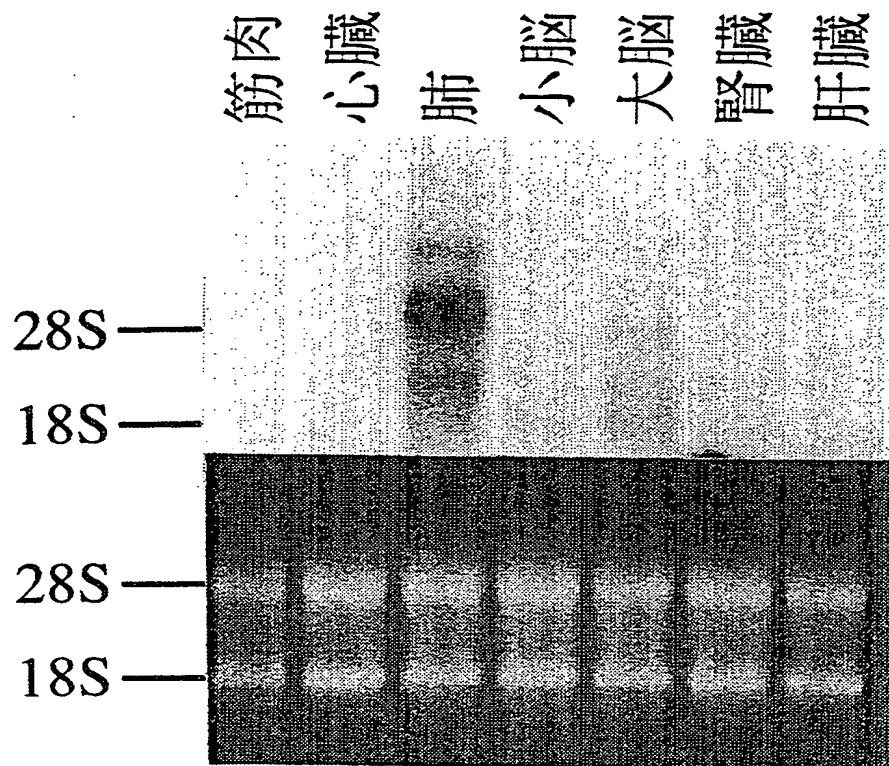
【図2】

図面代用写真



【図3】

図面代用写真



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 成体の中枢神経系全般に強く発現する新規なセマフォリン、セマフォリンWを提供することにより、中枢神経再生に係わる医薬、あるいは該セマフォリンWに関する研究のための試薬を提供することを課題とする。

【解決手段】 成体の中枢神経系で強く発現する新規なセマフォリン遺伝子、その発現タンパク質及び該セマフォリンの部分ペプチド、抗体、該セマフォリン遺伝子に相補的なDNA又はRNA、該セマフォリンを用いた阻害物質のスクリーニング方法、該スクリーニングにより得られる阻害物質、該阻害物質よりなる中枢神経の再生治療促進剤等。

【選択図】 なし

特平 8-287636

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000183370

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

【氏名又は名称】

住友製薬株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100107629

【住所又は居所】

大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住

友製薬株式会社 法務部内

【氏名又は名称】

中村 敏夫

特平 8-287636

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日	1990年 8月 9日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
氏 名	住友製薬株式会社